

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

Práce byla vypracována v laboratoři Vývojové epileptologie, Fyziologického ústavu Akademie věd ČR
v Praze

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Imunologie



Bc. Libor Uttl

Aktivace neuroglií po epileptickém statu vyvolaném intracerebroventrikulární aplikací

4-aminopyridinu u potkana

Activation of neuroglia after status epilepticus induced by intracerebroventricular application of

4-aminopyridine in the rat

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce/Školitel:

doc. MUDr. Jakub Otáhal, Ph.D.

Praha, 2013

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 15. 8. 2013

Podpis:

Poděkování:

Rád bych poděkoval vedoucímu své diplomové práce za odborné vedení a osobní přístup při řešení diplomové práce. Dále bych velmi rád poděkoval Mgr. Grygoriyi Tsenovovi. PhD a všem členům z oddělení Vývojové epileptologie, FGÚ AV, v.v.i za jejich cenné rady a ochotu pomoci s řešením tématu diplomové práce. A v neposlední řadě moc děkuji své rodině za podporu a možnost věnovat se vysokoškolskému studiu.

Abstrakt

Epilepsie je chronické onemocnění, které je charakterizováno výskytem spontánních epileptických záchvatů. Toto onemocnění postihuje 1 % světové populace. Pro studium epilepsie je nezbytný dostatek vhodných modelů, které by odpovídaly různým případům rozvoje epilepsie. My jsme rozhodli pro detailní popsání modelu vyvolání epileptického statu u dospělého potkana pomocí intracerebroventrikulární aplikace 4-aminopyridinu (4-AP). Pro popsání tohoto modelu jsme využili metody histologie a imunohistochemie, imunoblot z důrazem na markery mikrogliaální aktivity a sérii behaviorálních testů pro zjištění funkčního vlivu epileptického statu (SE) v dlouhém časovém úseku (8 měsíců). U tohoto modelu jsme popsali schopnost 4-AP vyvolat SE. Následkem SE došlo k degeneraci neuronů a k mikrogliaální aktivaci. Oblasti s umírajícími neurony výrazně odpovídaly oblastem s aktivovanými mikroglie. Pomocí imunoblotu jsme prokázali oxidativní stres nárůstem 3-nitrotyrosinu již po 2 hodinách od vzniku SE. Aktivace mikroglie zjištěná pomocí imunohistochemie odpovídala zjištěnému nárůstu produkce IL-1 β a CD68 po SE. V návaznosti na tyto výsledky jsme ověřili funkční vliv epileptického statu u zvířat v dlouhodobém pokusu. Po 8 měsících od SE jsme nepozorovali žádné výrazné změny kognitivních a motorických funkcí.

klíčová slova: epilepsie, 4-aminopyridin, status epilepticus, mikroglie, 3-nitrotyrosin,

Abstract

Epilepsy is a chronic disease characterized by spontaneous epileptic seizures. One percent of the world population is affected by the epilepsy. The existence of proper models is crucial for study of distinct types of epilepsy. We decided to deeply describe the model of status epilepticus (SE) induction in an adult rat by the intracerebroventricular application of 4-aminopyridine (4-AP). For description of this model we used the histology and immunohistochemistry methods, the western blot analysis focused on the microglial activation markers, and the series of behavioral tests to reveal the functional influence of SE in chronical experiment (8 months). We described the ability of the 4-AP to induce SE in this model. After SE, neuron degeneration and microglial activation appeared. The areas of degenerated neurons strongly corresponded to the regions with activated microglia. By the western blotting we demonstrated the oxidative stress by an increase of 3-nitrotyrosine already 2 hours after SE. Microglial activation detected by the immunohistochemistry correlated to the observed increase in IL-1 β and CD68 production after SE. Considering these results we verified the functional influence of the SE in chronical experiment. We did not observe any significant changes of cognitive and motoric functions 8 months after SE.

keywords: epilepsy, microglia, status epilepticus, 4-aminopyridine, 3-nitrotyrosine

Obsah

Abstrakt.....	1
Abstract.....	2
Seznam zkratk	4
Úvod:	5
Literární přehled :.....	6
Epilepsie	6
Epidemiologie.....	6
Status epilepticus - Buněčné a molekulární změny v mozku dospělého potkana po epileptickém statu	8
Neuroglie v CNS.....	14
Modely	16
Cíle práce:.....	18
Metody a materiál:.....	19
Zvířata	19
Vyvolání epileptického statu	19
Hodnocení poškození mozkové tkáně po epileptickém statu	22
Barvení	22
Imunoblot.....	25
Behaviorální testy	28
Vyhodnocení morfologického a imunohistochemického barvení	31
Výsledky :	32
Vyvolání epileptického statu	32
Vyhodnocení morfologického a imunohistochemického barvení	33
Vyhodnocení imunoblot.....	50
Behaviorální testy	55
Diskuze:	60
Status epilepticus vyvolaný ICV aplikací 4-AP	60
Neurodegenerace a imunitní reakce po SE vyvolaným 4-AP	60
Oxidativní stres po SE vyvolaným 4-AP	62
Funkční důsledky SE vyvolaným 4-AP	63
Závěr:.....	64
Použitá literatura:	65

Seznam zkratek

3-NT	3-nitrotyrozin
4-AP	4-aminopyridin
AMPA	2-amino-3-(5-methyl-3-oxo-1,2-oxazol-4-yl)propanová kyselina
CNS	centrální nervový systém
DAB	3,3'-diaminobenzidine tetrachlorhydrát
EEG	elektroencefalogram
FeTPPS	$C_{44}H_{28}ClFeN_4O_{12}S_4$
FJB	FluoroJade B
GABA	kyselina γ -aminomáselná
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
HS	skleróza hipokampu
ICV	intracerebroventrikulární
IL-1β	Interleukin -1beta
IL-6	Interleukin 6
ILAE	mezinárodní liga proti epilepsii
iNOS	inducibilní oxid dusnatý syntáza
ISF	isofluran
MnTMPYP	$C_{44}H_{36}MnN_8Cl_5$
MWM	Morrisovo vodní bludiště
NMDA	N-methyl-D-asparagová kyselina
nNOS	neuronální syntáza oxidu dusnatého
NOS	syntáza oxidu dusnatého
PBS	fosfátový pufr
PIC	směs inhibitorů proteáz
PVA	parvalbumin
ROS	reaktivní formy kyslíku
SDS	sodium dodecyl sulfát
SE	status epilepticus
SLB	nanášecí pufr pro vzorek
SOD	superoxiddismutáza
TNFα	Tumor nekrotizující faktor alfa
WHO	Světová zdravotnická organizace

Úvod:

Přínosem této diplomové práce je zavedení a podrobné popsání modelu epileptického statu (SE), vyvolaného bilaterální intracerebroventrikulární aplikací 4-aminopyridinu (4-AP) u dospělého potkana. Téma mé diplomové práce je součástí rozsáhlé studie, zabývající se oxidativním stresem během SE. Na pracovišti Vývojové epileptologie, FGÚ AVČR v.v.i. se věnují modelu SE vyvolaného 4-AP u mláďat docent Otáhal a doktorka Folbergrová. Tato diplomová práce nabízí možnost použití modelu 4-AP u dospělých zvířat. Důvodem, proč jsme se rozhodli zavést model 4-AP, je možnost modelovat epileptickou aktivitu *in vitro* (tkáňové kultury, řezy hipokampu) a také *in vivo* (u mláďat i dospělých jedinců, ať volně pohyblivých nebo v anestezii) a také následné samovolné odeznění záchvatu. Způsob aplikace 4-AP jsme zvolili z důvodu omezení vlivu 4-AP na periferní nervový systém a pro generalizaci záchvatu.

Vyvolání SE je nejčastěji používaný inzult v experimentální epileptologii. Slouží k navození následné spontánní epileptické aktivity. Rozsah a charakter poškození při SE závisí na použitém modelu, místě vzniku epileptické aktivity, době trvání záchvatu, věku zvířete ale také na případném použití anestezie v době SE nebo okolní teplotě. V akutní fázi během SE dochází k poškození mozkové tkáně, tvorbě nitrosativního a oxidativního stresu, k molekulárním změnám na přežívajících neuronech a gliích. V následné latentní a chronické fázi dochází k synaptické reorganizaci a změnám ve struktuře a počtu receptorů. Tyto změny v mozkové tkáni mají velmi významnou roli v následné epileptogenezi.

Literární přehled :

Epilepsie

Epidemiologie

Podle Světové zdravotnické organizace (WHO) epilepsií trpí nejméně 50 milionů lidí, přičemž přibližně 80 % pacientů s epilepsií žije v rozvojových zemích. Přibližně 10 % všech lidí během života prodělá alespoň 1 epileptický záchvat.

Ve vyspělých zemích se nárůst nových případů epilepsie pohybuje mezi 40-70 na 100 000 obyvatel. V rozvojových zemích je nárůst nových případů epilepsie přibližně 2 krát vyšší z důvodu horší zdravotní péče a vyššího rizika trvalého poškození mozku úrazem nebo infekcí. Riziko předčasného úmrtí lidí trpících epilepsií je 2-3 krát vyšší než u běžné populace.

Pacienti trpící epilepsií reagují na léčbu antiepileptiky v 70 % případech, tj. nedochází u nich k žádným epileptickým záchvatům. Po 2-5 letech úspěšné léčby může být léčba antiepileptiky ukončena u 70 % dětí a 60 % dospělých bez relapsu onemocnění. Bohužel v rozvojových regionech se dostane lékařské péči jen 25 % pacientů trpících epilepsií (v Africe dokonce jen 10 % pacientů) (internetové zdroje, 2).

Definice

Epilepsie je označení souboru syndromů, které jsou charakterizované opakujícími se spontánními epileptickými záchvaty, přičemž výskyt samotného epileptického záchvatu nemusí znamenat rozvoj epilepsie.

Epileptický záchvat vzniká abnormální synchronizovanou aktivitou velkého počtu neuronů, při které dojde k vychýlení rovnováhy mezi excitací a inhibicí. Epileptické záchvaty lze rozdělit podle velikosti zasažené části mozku na parciální a generalizované záchvaty. Parciální záchvat je epileptická aktivita, lokalizovaná v jedné hemisféře mozku a nedochází k jejímu šíření do dalších oblastí mozku. Během parciálního záchvatu zůstává pacient při vědomí. Při generalizovaném záchvatu dochází k šíření epileptické aktivity z epileptického ložiska do obou hemisfér. Během generalizovaného záchvatu může docházet ke ztrátě vědomí. Parciální záchvaty se mohou v některých případech šířit v mozkové tkáni a přecházet v sekundární generalizovaný záchvat (Kubova, 2002).

Speciálním případem epileptického záchvatu je epileptický status (SE), který je definován (dle ILAE, Mezinárodní ligy proti epilepsii, internetové zdroje 1), jako nepřetržitý epileptický záchvat nebo několik po sobě jdoucích záchvatů trvajících po dobu minimálně 30 minut. Během SE dochází ke ztrátě vědomí a v případě po sobě jdoucích záchvatů nedochází k zotavení pacienta mezi nimi.

Epileptogeneze

Termín epileptogeneze označuje proces vedoucí k rozvoji epilepsie. Zahrnuje veškeré změny (od molekulárních změn na úrovni regulace genové exprese, přes strukturní změny během ontogenetického vývoje mozku až po funkční změny na úrovni chování, nebo schopnosti učení), které souvisí s rozvojem epilepsie nebo se zhoršujícím průběhem onemocnění v čase (Kubova, 2002).

Rozvoj epilepsie může být způsoben geneticky podmíněnými faktory, nebo morfologickými abnormalitami – primární (vrozená) epilepsie. Vyznačuje se například mutacemi na napěťových, nebo ligandem řízených kanálech. Příkladem může být prodloužení depolarizace a následné nadměrné uvolnění neurotransmiterů, nebo mutace na

podjednotkách receptorů pro neurotransmitery, např. snížení inhibičního vlivu kyseliny γ -aminomáselné (GABA).

Druhým případem vzniku je tzv. sekundární (získaná) epilepsie. Sekundární epilepsie vzniká jako důsledek poškození mozkové tkáně. Příkladem mohou být různé úrazy hlavy, infekce, ischemické poškození, nádory v mozkové tkáni, neurodegenerativní onemocnění (Alzheimerova choroba, roztroušená skleróza), nebo důsledek požívání drog nebo alkoholu.

Časové rozdělení epileptogeneze podle Bendera a Baramové (Bender and Baram, 2007)

Akutní fáze: v akutní fázi během inzultu dochází k poškození mozkové tkáně (odumírání neuronů pro epileptogenezi není nezbytné), deterioraci mozkových funkcí a k molekulárním i systémovým změnám na úrovni neuronů, glií a hematoencefalické bariery.

Klidová fáze: V klidové fázi nedochází k epileptickým záchvatům, dochází k zotavování a k přechodnému funkčnímu zlepšení, synaptické reorganizaci. V tkáni dále probíhají změny podporující epileptogenezi. Příkladem mohou být změny v počtu a složení receptorů, čímž dochází k vychýlení rovnováhy mezi excitační a inhibiční funkcí.

Chronická fáze: V chronické fázi dochází k objevení spontánních rekurentních záchvatů, které mohou přetrvávat do konce života. Spontánními záchvaty dochází k opakování akutní fáze, následné progresi funkčního poškození a progresi epilepsie.

Status epilepticus - Buněčné a molekulární změny v mozku dospělého potkana po epileptickém statu

Neurodegenerace

Status epilepticus vyvolaný u laboratorních zvířat vede u většiny modelů k poškození až odumírání neuronů (Fujikawa, 2005; Pitkanen et al., 2002). Rozsah, lokalizace a dynamika těchto dějů je vysoce závislá na typu modelu a především na věku. U mladších zvířat např. u potkana do 18. postnatálního dne je poškození rozsahem výrazně menší, ale ojedinělé degenerující neurony lze detekovat po celý zbytek života (Dube et al., 2000). Dospělá zvířata po epileptickém statu prodělávají většinou masivní neurodegeneraci limbických struktur

v závislosti na způsobu vyvolání SE. U modelů temporální epilepsie (např. pilokarpin, kainát) nacházíme degeneraci hipokampových polí v cornu amonis (CA1-4), ačkoliv vstupní struktura do hipokampu tj. gyrus dentatus nevykazuje významné morfologické změny krátce po SE. Degenerace pyramidových buněk v hipokampových polích především v CA3 a tzv. hilu gyrus dentatus (CA4) je po většinu provázena pučením mechoých vláken tj. axonů granulárních buněk gyrus dentatus. Tato vlákna, která neurodegenerací přišla o svůj přirozený cíl, rostou (pučí) a hledají náhradní cíl, kterým se zpravidla stává samotná granulární vrstva gyrus dentatus. Takto vzniká tzv. reverbační okruh, který pravděpodobně hraje významnou roli v epileptogenezi (Amano et al., 1999).

Obdobný histopatologický nález nacházíme i v resekátech tkáně u pacientů podstupující hipokampektomii pro na léčbu rezistentní epilepsii. Skleróza hippocampu (HS) je nejčastější poruchou pozorovanou ve tkáni resekované pro farmakorezistentní epilepsii temporálního laloku (Zámečník J., Tichý M, 2005). Základní histologické nálezy jsou u HS principiálně dva - úbytek až chybění neuronů selektivně v určitých oblastech a reaktivní proliferace gliových buněk. Tyto změny lze nejlépe pozorovat v řezech barvených Nisslovou modří a při imunohistochemickém průkazu GFAP (Glial fibrillary acidic protein). Klinicko-patologicky jsou tradičně definovány tyto skupiny HS:

A. Klasická HS charakterizovaná úbytkem až vymizením pyramidových neuronů a gliózou v zónách hipokampu CA1 (Sommerův sektor) a CA4 („endfolium“), v prosubikulu a v gyrus dentatus. Méně vyjádřené bývají změny v sektoru CA3, rezistentní zóna (CA2) bývá většinou nepostižena.

Imunohistochemickými studiemi se prokázalo, že úbytek neuronů postihuje v hipokampu selektivně nejen jednotlivé sektory, ale také pouze neurony určitých neurotransmiterových systémů. Úbytek neuronů můžeme pozorovat při imunohistochemickém průkazu synaptofyzinu ve tkáňovém řezu.

B. Skleróza endfolia - v těchto případech jsou úbytek neuronů a glióza omezeny na sektor CA4 (někdy i CA3), společně se změnami v multifonní vrstvě gyrus dentatus. Tento typ HS bývá pozorován především v souvislosti s další patologickou lézí mimo hipokampus (v rámci tzv. duální patologie).

C. Úplná HS s postižením celé hipokampální formace. Uvádí se, že může vzniknout z klasické HS, ale častěji bývá odrazem nespecifických změn nejčastěji hypoxicko-ischemického původu. Mimo výše uvedené změny bývají u HS v různém rozsahu přítomny i další

nespecifické poruchy hipokampální formace - tzv. mikrodysgeneze granulární vrstvy gyrus dentatus ve formě její fragmentace nebo disperze a přítomnost početných polyglukosanových tělísek (corpora amylacea). (Zámečník J., Tichý M, 2005). V patofyziologii epilepsie hraje pravděpodobně velmi výraznou roli různá citlivost neuronálních populací na zátěžové situace (status epilepticus, perinatální hypoxie/ischemie, trauma, zánětlivá onemocnění mozku). Některé populace neuronů, především inhibiční interneurony, se zdají být více náchylné (Magloczky and Freund, 2005). Tato náchylnost k poškození je velmi závislá na věku. Například parvalbumin pozitivní interneurony, jejichž odumírání se spojuje s rozvojem epilepsie a schizofrenie, jsou vysoce citlivé na oxidativní a to především v průběhu časně postnatálního života (u potkana 2. postnatální týden). Důvody této selektivní vulnerability nejsou přesně známy, ale předpokládá se relativní neefektivita endogenních antioxidačních kaskád. (Behrens and Sejnowski, 2009)

Oxidativní a nitrosativní stres

Oxidativní stres se významným způsobem podílí na procesu excitotoxicity, která hraje hlavní roli na poškození mozku během epileptického záchvatu. Během epileptického záchvatu dochází k hromadění glutamátu v synaptické štěrbině způsobené nadměrným uvolňováním glutamátu z presynaptického neuronu, nebo sníženou aktivitou glutamátových transporterů na astrocytech. Snížení transporterové aktivity je často způsobeno poškozením volnými radikály během předchozích záchvatů (Chen et al., 2010). Nadměrná koncentrace glutamátu aktivuje AMPA (2-amino-3-(5-methyl-3-oxo-1,2-oxazol-4-yl)propanoic acid) a NMDA (*N*-Methyl-D-aspartate) receptory na postsynaptické membráně. Důsledkem aktivace těchto receptorů je masivní nárůst intracelulární koncentrace Ca^{2+} v postsynaptickém neuronu. Ca^{2+} plní v buňkách funkci druhého posla a reguluje aktivitu velkého množství enzymů. Z hlediska oxidativního stresu se jedná hlavně o aktivaci cyklooxygenáz a syntáz oxidu dusnatého (NOS). Nadměrnou aktivitou těchto enzymů dochází ke zvýšené tvorbě kyslíkatých a dusíkatých radikálů, které není buňka schopná odstranit pomocí vlastních antioxidačních systémů. Z důvodu zvýšené zátěže volnými radikály dochází k poškození proteinů a lipidů oxidací a S-nitrosylací, k poškození DNA, a k inhibici mitochondriálního dýchacího řetězce. Inhibice mitochondriálního řetězce má za následek další produkci volných radikálů a případnou apoptickou smrt silně poškozených buněk (Cock et al., 2002; Liang et al., 2000; White et al., 2000).

Na rozdíl od produkce ROS (reaktivní formy kyslíku), které jsou považovány během epileptického záchvatu za toxické, je vliv oxidu dusnatého (NO) na průběh epileptického záchvatu a výsledné poškození stále ve fázi výzkumu. Některé vědecké práce poukazují na neuroprotektivní vliv NO (de Vasconcelos et al., 1998; Han et al., 2011), ale velké množství prací také na epileptogenní vliv NO (Barbiro-Michaely et al., 2011; Kovacs et al., 2009). Rozdílné výsledky zřejmě souvisejí s využíváním různých modelů epilepsie, stářím použitých zvířat (což souvisí s ontogenetickým vývojem mozku), způsobem vyvolání epileptického záchvatu a použitým inhibitorem NOS (nejen jeho specifitou k různým isoformám NOS, ale také s dobou a způsobem podání inhibitoru v pokusu) (Wojtal et al., 2003).

Nicméně je prokázán velmi výrazný nárůst *de-novo* exprese neuronální syntázy NO (nNOS) v místech s epileptickou aktivitou (Gonzalez-Martinez et al., 2009) a také zvýšená odolnost NO produkujících neuronů při SE (Lumme et al., 2000).

Neurogeneze a synaptická reorganizace

Parciální i generalizované záchvaty mohou vyvolávat synaptickou reorganizaci po celý život. Vysoká míra synaptické reorganizace je pozorována hlavně u dospělých potkanů se silnou epileptickou aktivitou, ale výrazně záleží na použitém modelu epilepsie a na věku zvířat (Turski et al., 1983). Důležitá otázka je, jestli je reorganizace synaptického spojení přínosem (obnovení mozkových funkcí), nebo spíše podporuje následnou progresi epilepsie a zvyšuje dráždivost tkáně.

Jak bylo uvedeno dříve, u většiny modelů epilepsie tj. kde dochází k rozvoji spontánních záchvatů, lidské resekované tkáni, ale dokonce i v tkáni získané postmortem a to jak lidské tak i od domácích zvířat trpících epilepsií, lze nalézt vznik arteficiálních spojů granulárních buněk se sebou samými nebo sousedícími granulárními buňkami. Takto vzniklý reverbační okruh hraje pravděpodobně významnou roli při vzniku epilepsie. Přesný mechanismus vzniku tj. proč jsou vlákna po ztracení svého přirozeného cíle atrahována zpět gyrus dentatus není známo. (Rakhade and Jensen, 2009)

U mozku dospělého potkana po epileptickém statu byl popsán vznik nových neuronů. Hlavně v oblasti gyrus dentatus a CA3 oblasti hipokampu a také v oblasti amygdaly. Většina nově vzniklých neuronů jsou granulární neurony (Parent et al., 1998). Tyto nové granulární neurony mají výrazně nižší práh excitability, než zralé granulární neurony a mohli by tak přispívat k rozvoji epilepsie zvýšením excitace pyramidových buněk v CA3 oblasti (Scharfman et al., 2000).

Glióza

U mozkové tkáně po SE a při dalším chronickém rozvoji epilepsie je typický nárůst proliferace astrocytů. V hipokampální oblasti gyrus dentatus až o 46 % po 7 dnech od SE. Toto zvýšení počtu astrocytů přetrvává až 2 měsíce (Adams et al., 1998).

V závislosti na míře poškození tkáně dochází také k masivní proliferaci mikroglíí v poškozené tkáni. Jako příklad uvádím práci od Beach et al., kde je popsán trojnásobný nárůst počtu mikroglíí v hipokampální oblasti CA3 a jedenáctinásobný nárůst v hipokampální oblasti CA1 (Beach et al., 1995)).

Změny genové exprese

Po epileptogenním inzultu dochází také k významným změnám v genové expresi v souvislosti s procesy epileptogeneze, apoptické smrti neuronů, reorganizaci synaptických spojení a k aktivaci imunitní odpovědi (Lukasiuk et al., 2006). Změny exprese různých skupin genů jsou závislé na inzultu a na vybrané mozkové struktuře. Mimo jiné také velmi závisí na vybraném kmeni zvířete. Sandberg et al. ukázali významný rozdíl v genové expresi mezi odebranou tkání z mozečku a hipokampu u dvou myších kmenů (C57BL/6J a 129/SvEvTac). Hodinu po vyvolání SE pomocí pentylenetetrazolu došlo k expresi přibližně 90 genů. Výraznější změny v genové expresi byly pozorovány v hipokampu. Z hlediska myších kmenů byl také prokázán až 4krát větší nárůst exprese v hipokampu u C57BL/6J než u 129/SvEvTac (Sandberg et al., 2000).

Neuroglie v CNS

Gliové buňky jsou největší skupinou buněk v centrálním nervovém systému (CNS). Jejich funkce jsou velmi rozmanité a ovlivňují téměř každý aspekt funkce nervového systému. Zajišťují pro nervový systém strukturní funkci, reagují na poškození tkáně, zajišťují homeostázu v extracelulárním prostoru, tvoří a regulují přenos přes hematoencefalickou bariéru, zajišťují myelinizaci axonů, regulují neurogenezi a také migraci buněk v CNS. Oproti neuronům mají také vysokou schopnost proliferace

Hlavní druhy gliových buněk, které ovlivňují epileptogenezi jsou astrocyty, mikrogilie a oligodendrocyty.

Astrocyty mají významnou strukturní roli, kdy slouží jako opěrné lešení pro neurony, ale také zajišťují distribuci neuronů při neurogenezi. Velmi významně se účastní synaptické interakce, přispívají k modulaci neuronální odpovědi a řídí lokální průtok krve (Schummers et al., 2008). Další velmi významnou funkcí astrocytů je již zmiňovaná funkce udržování homeostáze v CNS. Astrocyty jsou schopny kontrolovat extracelulární koncentraci iontů (zejména K^+). Regulací koncentrace iontů také řídí homeostázi vody v CNS. Mimo to tvoří hematoencefalickou bariéru a zajišťují transport glukózy z krevního oběhu. Během synaptické interakce regulují koncentraci hlavních synaptických neurotransmiterů, jako je glutamát, GABA a glycin, jejich odstraňováním ze synaptické štěrbině (Sofroniew and Vinters, 2010). V poslední době se ukazuje, že astrocyty jsou schopné uvolňovat zánětlivé cytokiny (interleukin-1 beta (IL-1 β), interleukin 6 (IL-6)), které výrazně zvyšují excitabilitu tkáně (Aronica et al., 2012; Vezzani et al., 2011; Viviani et al., 2003). Při poškození tkáně dochází k velké proliferaci astrocytů, které se účastní společně s mikrogliemi tvorby gliové jizvy (Sofroniew, 2009). Astrocyty mohou také přispět k epileptogenezi regulací koncentrace neuropřenašečů v synaptické štěrbině při snížené funkci glutamátových transporterů. Epileptogenezi může podporovat i snížení exprese nebo funkčnosti K^+ kanálů a poškození aquaporinu 4, při kterém dochází k výraznému oslabení schopnosti udržovat homeostázu K^+ a následnému zvýšení excitability tkáně (Eid et al., 2005).

Mikroglie fungují jako hlavní imunitní buňky v CNS, mohou se vyskytovat ve stavu perzistující mikroglie a aktivované mikroglie. Perzistující mikroglie kontroluje své okolí a má výrazně vláknitou strukturu. Ve formě aktivované mikroglie je schopna vysoké míry proliferace, pohybu, fagocytózy a sekrece. Mikroglie jsou schopny produkovat kyslíkaté radikály (ROS), oxid dusnatý, proteolytické enzymy, složky komplementu a zánětlivé cytokiny (IL-1b, IL-6, TNF α). Produkci složek komplementu a cytokiny mohou aktivovat další gliové buňky a astrocyty, čímž podporují probíhající zánět. Z hlediska epileptogeneze také produkce prozánětlivých cytokinů podporuje hyperexcitabilitu tkáně jako v předchozím případě u astrocytů (Aronica et al., 2012; Vezzani et al., 2011; Viviani et al., 2003). Dalším způsobem, kterým mohou ovlivňovat epileptogenezi a rozvoj poškození následkem epileptických záchvatů je oxidativní stres (viz. kapitola oxidativní a nitrosativní stres). Mikroglie se ale také významně podílejí na myelinizaci i demyelinizaci neuronů. Produkci prozánětlivých interleukinů a produkci kyslíkových radikálů výrazně podporují demyelinizaci (McTigue and Tripathi, 2008). Naopak pozitivní vliv mikroglie na remyelinizaci neuronů byl pozorován na myším modelu, který neprodukoval tumor nekrotizující faktor α (TNF α). U zvířat bez TNF α docházelo k výraznému zpomalení remyelinizace a také k celkovému snížení počtu zralých oligodendrocytů (Arnett et al., 2001).

Oligodendrocyty zajišťují tvorbu myelinové pochvy okolo axonů. Mimo izolační funkce při přenosu signálu zajišťují také produkci růstových faktorů pro neurony, ovlivňují průměr axonálních vláken, rozložení iontových kanálů na axonech a hromadění Na⁺ kanálů v Ranvierových zářezech, což je nezbytné pro saltatorní vedení signálu (Barres, 2008). Asociace oligodendrocytů s neurony je nezbytná pro přežití oligodendrocytu – neuronální axon je zdrojem survival signálu. Oligodendrocyty jsou výrazně citlivé na oxidační stres, excitotoxicitu a zánětlivé reakce (McTigue and Tripathi, 2008).

Modely

Z důvodu širokého souboru syndromů vyznačujících se opakovanou spontánní epileptickou aktivitou je nezbytné zajistit dostatečně širokou paletu modelů epilepsie. Tyto modely dají nové možnosti pro studium vzniku epilepsie různého typu, pro vývoj nových antiepileptik a nových terapeutických strategií, které by zabránili rozvoji epilepsie. Tyto modely by měli nejen pomoci sledovat různé aspekty epileptogeneze, ale také z hlediska významného počtu pacientů v dětském věku zohlednit různou zralost mozku. Nejčastěji se v praxi využívají k vyvolání epileptického statu chemické modely a elektrická stimulace. U dospělého zvířete se oba druhy vyvolání epileptického statu využívají přibližně stejně často. Pro studium epilepsie u mláďat se mnohem častěji používá chemický model z důvodu technických problémů při dlouhodobé elektrické stimulaci. Hlavními problémy použití dlouhodobé elektrické stimulace je rychlý růst lebky, který zabraňuje dlouhodobému umístění elektrod, a také tenké lebeční kosti, u kterých je vyšší riziko poškození mozku při zákroku (Kubova, 2002). Pro stručné srovnání uvádím nejčastěji využívané chemické modely kainátu a lithium-pilokarpinu s modelem 4-AP.

4-aminopyridin

4-AP je neselektivní inhibitor napěťově řízených draselných kanálů. Inhibicí draselných kanálů dochází k prodloužení doby trvání akčního potenciálu, čímž se výrazně zvyšuje neuronální aktivita glutamatergní a GABAergní přenos signálu. Hlavní výhodou, pro kterou jsme zvolili toto konvulzivum je schopnost vyvolání záchvatu podobné aktivity *in vitro* v případě neuronálních buněčných kultur a řezech mozku (Avoli et al., 1996), tak i vyvolání epileptického záchvatu *in vivo* u mláďat, dospělých zvířat. 4-AP je schopen vyvolat záchvatovou aktivitu dokonce i v 1.5% ISF anestezii, přestože má anestezie anti-konvulzivní účinky (ověřeno v laboratoři Vývojové epileptologie, FGÚ AVČR, v.v.i.). Při intraperitonální aplikaci 4-AP dochází k masivnímu zasažení periferního nervového systému a následným systémovým komplikacím, které zpravidla vedou k úhynu zvířete. Z tohoto důvodu je výrazně vhodnější použít intracerebroventrikulární aplikaci 4-AP, díky které je možno použít nižší koncentraci 4-AP a cíleným podáním omezit periferní efekt 4-AP.

Lithium-pilokarpinový model a kainátový model

Lokální nebo i systémové podání pilokarpinu nebo kainátu u potkana vede ke vzniku opakovaných limbických záchvatů a ke spuštění SE. SE může přetrvávat po dobu několika hodin. Po latentní fázi, která následuje po epileptickém statu dochází k rozvoji spontánních epileptických záchvatů (Leite et al., 2002). V případě pilokarpinového modelu lze dosáhnout epileptického statu při intraperitoneálním podání vysoké koncentrace pilokarpinu (300 mg/kg). Oproti tomu pokud se 2 až 24 hodin před podáním pilokarpinu podá intraperitoneálně chlorid lithný, tak dojde ke zvýšení citlivosti k epileptogennímu působení pilokarpinu a lze snížit dávku pilokarpinu 10krát při zachování stejné intenzity záchvatu (Chaudhary et al., 1999). Lithium-pilokarpinový model také výrazně snižuje úmrtnost zvířat omezením periferního vlivu na cholinergní nervový systém (Leite et al., 2002). Pilokarpin působí jako neselektivní agonista muskarinových receptorů a přes muskarinové receptory acetylcholinu zvyšuje amplitudu akčních potenciálů a indukuje epileptický status. Oproti tomu kainát je silný excitotoxin, který pomocí nadměrné aktivace AMPA receptorů zvyšuje vnitřní koncentraci Ca^{2+} a dále přispívá ke zvýšené transmisi glutamatergických synapsí. Kainát může být také podán lokálně i systémově. Při použití modelu kainátu dochází ale k výrazné mortalitě zvířat a jen u nízkého procenta potkanů dochází ke spontánní epileptické aktivitě. Toto lze omezit opakovaným podáváním nízkých dávek kainátu, čímž dojde ke snížení úmrtnosti na 15 %. Výrazně se také opakovaným podáváním kainátu zlepšuje epileptogenní efekt SE indukovaného kainátem. Téměř všechna zvířata po SE indukovaném opakovaným podáváním kainátu měla 2 a více spontánních záchvatů (Hellier et al., 1998).

Cíle práce:

Zavést a podrobně popsat model SE u bilaterální intracerebroventrikulární aplikace 4-AP u dospělého potkana

- Provést zhodnocení počtu degenerujících neuronů po 4-AP
- Provést zhodnocení aktivace mikroglíí po aplikaci 4-AP
- Kvantifikace oxidativního poškození po SE
- Zjištění kognitivních a motorických funkcí v chronickém experimentu po SE

Metody a materiál:

Zvířata

Pro náš experiment byli vybráni dospělí samci kmene Wistar ve věku 3měsíců. Zvířata byla chována ve standardních podmínkách (teplota místnosti 22°C, denní režim 12h světlo/12h tma, zvířata měla volný přístup k potravě a vodě).

Pokusy byly schváleny Odbornou komisí Fyziologického Ústavu AV ČR, v.v.i ve shodě se Zákonem o ochraně zvířat v ČR. Péče o zvířata a experimentální procedury byly prováděny v souladu se směrnicí EU č. 86/609/EHS

Vyvolání epileptického statu

Potkanům bylo podáno 20 nmol 4-AP (Sigma-aldrich, A78403) na zvíře. 4-AP byl rozpuštěného ve fosfátovém pufru (PBS) (Sigma-aldrich, P4417) a celkový objem dávky podané zvířeti byl 1 μ l. Aplikace 4-AP byla prováděna bilaterálně intracerebroventrikulárními kanylami (+0.8 mm od bregmy, 1,5 mm na levou a pravou stranu, 4 mm hluboko). Celá operace, aplikace 4-AP i následné ošetření zvířete probíhalo v 1,5% isofluranové anestezii. Zvířata byla umístěna samostatně do plastových boxů. Počátek SE byl počítán od výskytu klonických záchvatů. Doba, po kterou byla zvířata v SE, byla přibližně 3 hodiny. Podle Racinovi škály jsme část zvířat rozdělili do skupin pro stanovení proteinu pomocí immunoblotu a také jsme pomocí této škály vyřadili z pokusu zvířata s výrazně atypickým průběhem SE, který mohl být zapříčiněn například nevydařenou aplikací 4-AP.

Po skončení SE byla zvířatům věnována zvýšená péče (příjem vody, případně subkutánní aplikace fyz. roztoku 4ml/zvíře) a několik dní byla monitorována jejich váha pro potvrzení příjmu potravy. U kontrolních skupin byl podán PBS bilaterální intracerebroventrikulní aplikací v dávce 1 μ L na zvíře.

Míra rozvoje epileptického statu byla hodnocena pomocí modifikované Racinovi škály (Racine, 1972).

0 – normální chování

1 – stereotypní chování, projevy automatismů (čištění srsti, zvýšená explorace - čichání, naježení srsti (epileptická aktivita v oblasti hipokampu a její přechod do center talamu a amygdaly)

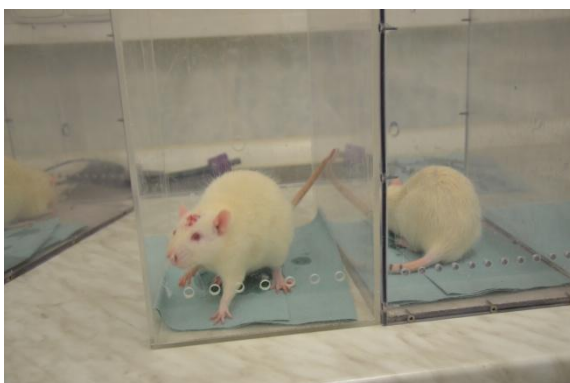
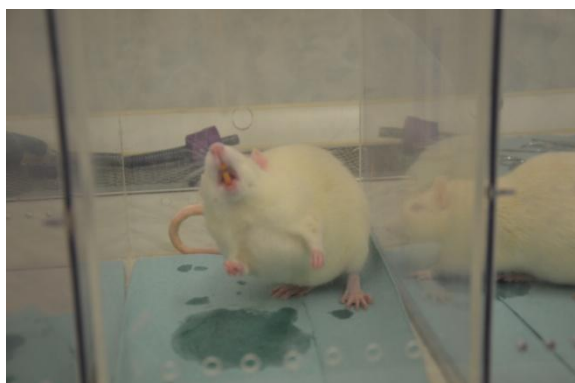
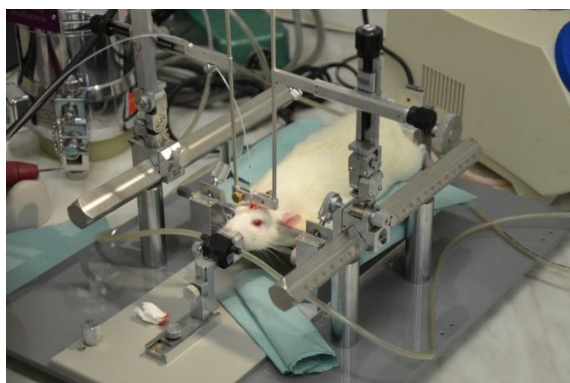
2 – záškuby jedné z předních končetin, přežvykování (přechod epileptické aktivity z epileptického ohniska do sensorimotorické kůry)

3 – záškuby obou předních končetin (přenesení epileptické aktivity z ohniska na obě hemisfery)

4 – stavění zvířete na zadní končetiny, roztažené zadní končetiny (zde dochází ke generalizaci tonicko-klonického záchvatu)

5 – ztráta vzpřimovacích reflexů zvířete, přepadávání na záda, (generalizovaný tonicko – klonický záchvat

Průběh intracerebroventrikulární aplikace 4-AP



Hodnocení poškození mozkové tkáně po epileptickém statu

Barvení

Příprava tkáně pro barvení

Zvířatům byla provedena transkardiální perfuze, kde v prvním kroku byl zvířatům podán 0,01M PBS (150ml/zvíře), čímž byla odstraněna většina krve z krevního řečiště. V druhém kroku byla zvířata fixována 4% paraformaldehydem (800ml/zvíře). Celá perfuze probíhala v uretanové anestezii (2g/kg i.p). Po skončení perfuze byly mozky vyjmuty a ještě postfixovány 3h při 5°C v 4% paraformaldehydu. Po postfixaci byla u mozků provedena kryoprotekce sacharózovou řadou (10%, 20%, 30% sacharóza v 0,01M PBS, pH 7,4) Po kryoprotekci byly mozky zmrazeny v suchém ledu a uskladněny v -80°C. Mozky byly zpracovány na kryomikrotomu Leica CM 1900 na 40um řezy (v 6-ti sériích).

Histologické barvení

Nisslovo barvení – kresyl. Violet'

Řezy natáhneme na podložní skla potažená želatinou a necháme zaschnout. Řezy necháme (1-4 hod) ve směsi 96% ethanolu s chloroformem v poměru 1:1. Poté následuje sestupná řada ethanolu (100%, 90%, 70%) a následně řezy opláchneme v destilované vodě okyselené kyselinou octovou. Takto připravené řezy barvíme roztokem Kresolové violeti. Po barvení violetí opět řezy propláchneme okyselenou destilovanou vodou a odvodníme vzestupnou řadou ethanolu (70%, 90%, 100%). Po opláchnutí řezů v 90% ethanolu je vhodné řezy zkontrolovat pod mikroskopem. Pokud není pozadí v okolí řezů dost světlé, je vhodné řezy ještě umístit do 70% ethanolu, kde se řezy ještě odbarví. Po absolvování vzestupné řady ethanolu přeneseme řezy do roztoků acetonu a xylenu (v poměru 2:1, 1:1, 1:2). Poté řezy přeneseme do čistého xylenu, kde je necháme do druhého dne. Druhý den podložní skla překryjeme krycími skly a zalepíme Solakrylem.

Fluorojade B barvení

Fluorojade B (Histo-chem Inc., 001462) je používán k histochemickému značení nevratně poškozených degenerujících neuronů pro jeho velmi vysokou senzitivitu (Schmued

et al., 1997). FluoroJade B barvení probíhá na podložním skle. Řezy natáhneme na podložní skla potažená želatinou a necháme přes noc vysušit při 37°C. Vysušené řezy inkubujeme ve 100% a následně v 70% ethanolu, propláchneme v destilované vodě a inkubujeme v 0,06% roztoku kalium permanganátu (Sigma-aldrich, 31404). Propláchneme v destilované vodě a inkubujeme v roztoku FluoroJadeB za tmy při stálém kývání. Poté propláchneme destilovanou vodou a necháme sušit přes noc v 37°C. Řezy odvodníme v xylenu, překryjeme krycími skly a zalepíme Solakrylem.

Imunohistologické barvení

Anti-CD11b (Ox-42) zakončené dobarvením DAB

Řezy přeneseme do čistých 24 jamkových destiček, 5krát propláchneme v 0,01M PBS a inkubujeme v 0,15% peroxidu vodíku (H_2O_2) v 0,01M PBS. Poté opět následuje proplach v 0,01M PBS, který 5krát opakujeme. Řezy inkubujeme v roztoku 0,1M glycinu a 0,1M lysinu. Po inkubaci dvakrát propláchneme 0,01M PBS a jednou v 0,3% roztoku Tritonu 100 v 0,01M PBS. Následuje zablokování řezů v roztoku v 0,3% roztoku Tritonu-100 v 0,01M PBS s přísadkou Biotinu H a koňského séra. Po blokování následuje inkubace s primární protilátkou CD11b(Ox-42) (Serotec, MCA275G) v koncentraci 1:5000 v 0,3% roztoku Triton-100 v 0,01M PBS s azidem sodným a koňským sérem. Inkubace s primární protilátkou probíhá 3 dny při 5°C za stálého kývání. Po inkubaci s primární protilátkou řezy opět přeneseme do laboratorní teploty a necháme 1 hod temperovat. Řezy přeneseme do čistých misek a 5krát propláchneme v 0,01M PBS, následně propláchneme řezy v 0,3% roztoku Tritonu-100 v 0,01M PBS a inkubujeme se sekundární protilátkou Anti-mouse IgG, konjugovaná s biotinem (Vector, BA2001) (1:200) v 0,3% roztoku Tritonu-100 v 0,01M PBS s koňským sérem. Po inkubaci řezy 5krát propláchneme v 0,01M PBS a inkubujeme v VectaStain ABC kitu (Vector, PK-4000). Řezy opět promyjeme 5krát 0,01M PBS a dobarvujeme v roztoku 3,3'-diaminobenzidine tetrachlorhydrátu (DAB). Poté řezy promyjeme v 0,01M PBS a natáhneme na podložní skla s želatinou. Řezy odvodníme krátkým ponořením do xylenu a zalepíme Solakrylem krycí skla.

Anti-parvalbumin (PVA) zakončené dobarvením DAB

Při barvení parvalbumin pozitivních neuronů pomoci protilátky proti Parvalbuminu (Chemicon, MAB1572) je postup barvení stejný. Použitá koncentrace primární protilátky PVA je 1:10 000, sekundární protilátka Anti-mouse IgG, konjugovaná s biotinem (Vector, BA2001) v koncentraci 1:200.

Imunoblot

Příprava homogenátu

Eutanazii potkana provedeme pomocí diethyletheru, následně provedeme dekapitaci hlavy potkana a v co nejkratším čase odebereme mozek. Z mozku odebereme požadované vzorky tkáně (hemisféru, mezimozek, mozeček, hipokampus a senzorimotorický kortex). Odebraný vzorek tkáně zvážíme a vložíme do homogenizační zkumavky. Přidáme PBS v poměru 4 ml na 1g tkáně a PIC (protease inhibitor cocktail) (Sigma-aldrich, P8340) 1ml PIC na 20g mokré tkáně. Od odebrání mozku je celý proces přípravy homogenátu prováděn na ledové tříšti. Samotnou homogenizaci provedeme na přístroji Helidolph-RZR2021 s nastavenou rychlostí 1200 otáček/min. Výsledný homogenát zcentrifugujeme na centrifuze (SIGMA 2-16 PK, 120951) na 1000g, při teplotě 4°C, po dobu 10 minut. Odebereme supernatant a skladujeme při teplotě -70°C.

Stanovení obsahu proteinů Lowryho metodou

Celkový obsah proteinů v supernatantu jsme stanovili Lowryho metodou pro sjednocení nanášky mezi různými vzorky. Připravili jsme si kalibrační řadu albuminu a napipetovali jsme ji do 120 jamkové destičky, poté jsme napipetovali požadovaný vzorek. Do jamek jsme přidali k napipetovaným vzorkům albuminu a supernatantu roztok A (5% sodium dodecyl sulfát (SDS), 0,8 M NaOH, CTC roztok (10% Na₂CO₃, 0,1% CuSO₄.5H₂O, 0,2% tartarát sodný)) a po 10 minutách přidáme ještě zředěné Folinovo činidlo v poměru 1:3 s redestilovanou vodou. Destičky jsme zalepili parafilmem a nechali přes noc na třepačce při teplotě 35°C. Druhý den jsme změřili na spektrofotometru Victor absorbanci jamek na destičce. Výsledné naměřené hodnoty jsme zpracovali pomocí programu GraphPad Prism, verze 5

Příprava vzorku na gel

Po rozmražení supernatantu vzorek dobře promícháme a odebereme potřebné množství a smícháme s SLB (solution loading buffer). Směs promícháme a necháme 20 minut v pokojové teplotě a poté umístíme na 10 minut do 70°C lázně a před nanášením na gel opět promícháme.

SDS elektroforeza a transfer

K separaci proteinů podle velikosti jsme použili klasickou SDS elektroforézu. Na zkušební elektroforézu jsme použili ručně připravované 10% polyakrylamidové gely, během samotného pokusu jsme využili již hotových komerčně dostupných polyakrylamidových gelů (Bio-rad Laboratories, 4561023, 4561043) o koncentraci 7,5 %, 12 % podle velikosti cílových proteinů. Elektroforéza probíhala v elektrodovém pufru při nastavení 250 V po dobu 21 minut. U NOS a IL-1b jsme z důvodu rozpadání NOS a absence signálu IL-1b použili napětí 150 V a po dobu 55 minut. K přenosu proteinů z gelu na membránu jsme použili „semi-dry“ transfer (Bio-rad, 170-4158) pomocí přístroje Turbo-transfer (Bio-rad Laboratoriem, 1704155) při napětí 30 V po dobu 7 minut. Pro přenos proteinů NOS a IL-1b jsme využili klasický mokrá transfer při napětí 30 V po dobu 14 hodin.

Značení protilátkami a vyvolání signálu na membráně

Po přenosu proteinů na nitrocelulózovou membránu jsme membránu zablokovali 4% roztokem sušeného mléka s azidem sodným. Po zablokování membrány byla membrána lehce promyta redestilovanou vodou a inkubována 2 hodiny s primární protilátkou (viz. Tab.1) v 1% roztoku sušeného mléka. Poté jsme membránu 3krát propláchli v promývacím pufru a 1 hodinu inkubovali se sekundární protilátkou (viz. Tab.1) v 1% roztoku sušeného mléka. Po skončení inkubace jsme membránu opět 3krát propláchli v promývacím pufru a 2krát v redestilované vodě. Membránu jsme vysušili filtračním papírem a nanесли jsme na ní substrát SuperSignálIR West Femto Maximum sensitivity substance (PIERCE, 34094). Membrána byla vyvolána na vyvolávačce filmů. Po vyvolání byla membrána 15 minut promývána ve stripovacím roztoku (Thermo scientific, 46430) a následně 3krát promyta v promývacím pufru. Po následném blokování membrány mohl být cyklus barvení ještě 2krát opakován.

Tabulka 1

Imunoblot					
Primární protilátka	kat.č./výrobce	koncentrace primar.Ab	koncentrace sekund. Ab	sekundární protilátka	kat.č./výrobce
IL-1 β	AB1832P millipore	1:10000	1:30000	Peroxidase conjugated IgG fraction monoclonal mouse Anit-Rabbit IgG	90209, Jackson Immunoresearch laboratories
CD68	MAB1435 millipore	1:5000	1:50000	Peroxidase conjugated IgG fraction goat Anti- mouse IgG	91032, Jackson Immunoresearch laboratories
nitrotyrosin	AB5411, millipore	1:5000	1:60000	Peroxidase conjugated IgG fraction monoclonal mouse Anit-Rabbit IgG	90209, Jackson Immunoresearch laboratories
aktin (IgM)	CP01-1EA, calbiochem	1:10000	1:10000	Goat-anti MOUse IgM (HRP-conjugate)	12-489, millipore

Behaviorální testy

Při všech behaviorálních testech byla zvířata přenesena z příručního zvěřince do místnosti, ve které probíhal konkrétní test. V této místnosti byla nechána minimálně 45 minut před začátkem experimentu, aby si na změnu prostředí zvířata zvykla a nebyl výsledek výrazně zkreslen stresem z transportu a nového prostředí. Během testování je důležité zvířata dále nestresovat ostrým světlem, hlukem, zbytečným pohybem v místnosti či výraznými pachy. Testování by mělo probíhat vždy v přibližně stejnou dobu, aby výsledky nebyly zkresleny rozdílnou aktivitou zvířat v průběhu dne.

Ladder test

Při testování zvířat pomocí ladder testu byl měřen čas, který zvířata potřebovala k překonání žebříku o délce 1 m a počet chyb (tj. propadnutí končetiny mezi příčkami žebříku v důsledku špatného odhadu zvířete). V našem uspořádání ladder testu zvířata absolvovala 1 měření na žebříku s pravidelným uspořádáním příček a 2 měření s nepravidelným uspořádáním příček na horizontálním žebříku. Nepravidelné uspořádání příček na žebříku je složitější pro koordinaci pohybu zvířete. Maximální doba zvířete strávená v jednom měření byla 60 sekund. Pokud zvíře v této době nepřekonal horizontální žebřík, tak pokus nebyl započítán.

Rotarod

Při testu motoriky a rovnováhy pomocí přístroje Rotarod, bylo zvíře vždy umístěno za ocas na otáčející se válec Rotarodu, který se otáčel podle nastavené rychlosti. Zvířata byla testována 4 - krát a to vždy na vyšší rychlost (10, 20, 25, 30 otáček za minutu). Rychlost se zvyšovala vždy až po ukončení testu všemi zvířaty. V každém pokusu jsme měřili dobu, po jakou se dokáže potkan udržet na otáčejícím se válci. Maximální doba, kterou jsme nechali zvířata umístěná v Rotarodu byla 120 sekund.

Habituační test – Open field

Při habituačním testu v open-fieldu (viz. Obr.1) jsme zvíře umístili do středu arény, následně vyhodnocovali lokomoční aktivitu zvířete, rozložení času stráveného v centru arény a času stráveného v blízkosti okraje. Za běžných okolností zvířata v novém prostředí exploruji po okraji arény, než si na nové prostředí navyknou. Oproti tomu čas strávený v centrální části arény poukazuje na snížení anxiety.

Obr.1



Morrisovo vodní bludiště (MWM)

Testování v Morrisovu vodním bludišti slouží ke zjištění schopnosti prostorové paměti, učení a prostorové orientace. Test probíhá v kruhovém bazénu o průměru 2 m, kde byl umístěn ostrůvek 1 cm pod hladinou. V místnosti s bazénem je stabilní teplota 23 °C, lehce tlumené světlo, a teplota vody by měla být přibližně 20 °C, aby zvířata byla motivována k hledání ostrůvku. Ostrůvek by měl být při zjišťování schopnosti učení celou dobu na stejném místě. Zvíře se orientuje při určování polohy ostrůvku podle vybavení místnosti a dvou výrazných značek umístěných na zdi místnosti. Cílem testu učení a prostorové paměti je schopnost zvířete najít ostrůvek. Zvíře se vkládalo do bazénu na 4 různých místech u okraje bazénu (v našem případě označeno Sever, Jih, Východ, Západ). Zvíře bylo při manipulaci drženo za ocas. Zvířata měla pět plavebních dnů a v každém dni zvířata absolvovala 8 plaveb. Zvíře plavalo v každém pokusu maximálně 60 sekund a v případě, že nenalezlo ostrůvek, tak na něj bylo umístěno. Na ostrůvku bylo zvíře ponecháno 30 sekund, aby se mohlo zorientovat. V testu jsme měřili čas zvířete potřebný k nalezení ostrůvku. Po absolvování plavání jsme zvířata vždy osušili papírovými osuškami a umístili zpět do boxů. Mimo tuto fázi učení jsme zvířata podrobili retenčnímu testu po 12 dnech od posledního dne plavání, abychom ověřili schopnost zapamatování si natrénované činnosti. A také jsme ověřili u všech zvířat nepoškozenou funkci zraku a to pomocí označení ostrůvku položením míčku.

Obr. 2



Vyhodnocení morfologického a imunohistochemického barvení

Vyhodnocení připravených řezů bylo prováděno na mikroskopu Olympus a zakreslováno do 8 průřezů mozkem podle neuroatlasu od George Paxinose a Charlese Watsona (Paxinos and Watson, 1998). Vybrané průřezy mozkem byly v těchto vzdálenostech od bregmy (2,2 mm, 1 mm, -0,26 mm, -1,4 mm, -2,56 mm, -4,16 mm, -5,2 mm, - 6,04 mm) a odpovídají oblastem používaným naší laboratoří v předchozí práci viz. (Brima et al., 2013). Zakreslené poškozené oblasti mozku, případně oblasti s výraznou aktivací mikroglie jsme poté z důvodu srovnání obodovali podle následující tabulky (Tab. 2).

Tabulka 2

oblast	FJB	CD11b
thalamus	0 = žádné poškození 1 = izolované bunky 2 = 1 jádro komplet 3 = více jader kompet 4 = kompletní destrukce	0 = žádná aktivace mikroglie 1 = izolované aktivované buňky 2 = 1 celé aktivované jádro 3 = více jader s aktivovanými mikroglie 4 = rozsáhlá aktivace napříč strukturou
Hipokampus	0 = žádné poškození 1= 1 hip. pole 2 = více hip. polí 3 = kompletní destrukce	0 = žádná aktivace mikroglie 1= 1 hip. pole aktivované 2 = aktivované mikroglie ve více hip. polích 3 = rozsáhlá aktivace napříč strukturou
Neocortex	0 = žádné poškození 1 = poškození 2-3 vrstvy 2 = poškození 2-3 vrstvy + izolované pyramidové bunky v 5. vrstvě	0 = žádná aktivace mikroglie 1 = aktivace v 2-3 vrstvě 2 = aktivace 2-3 vrstvy + izolované aktivované buňky v 5. vrstvě
Bazální ganglia	0 = žádné poškození 1= poškození	0 = žádná aktivace mikroglie 1= aktivace mikroglie
Amy (ECX+PCX)	0 = žádné poškození 1 = izolované jádro 2 = více jader nebo ECX 3= masivní poškození až po fissura rhinalis	0 = žádná aktivace mikroglie 1 = aktivace v 1 izolovaném jádře 2 = aktivace ve více jádrech nebo I v ECX 3= masivní aktivace až po fissura rhinalis

Výsledné skóre pro jednotlivé řezy, zvolené struktury a celé mozky bylo zpracováno statisticky pomocí Grubbova testu a oneway anova testu.

Výsledky :

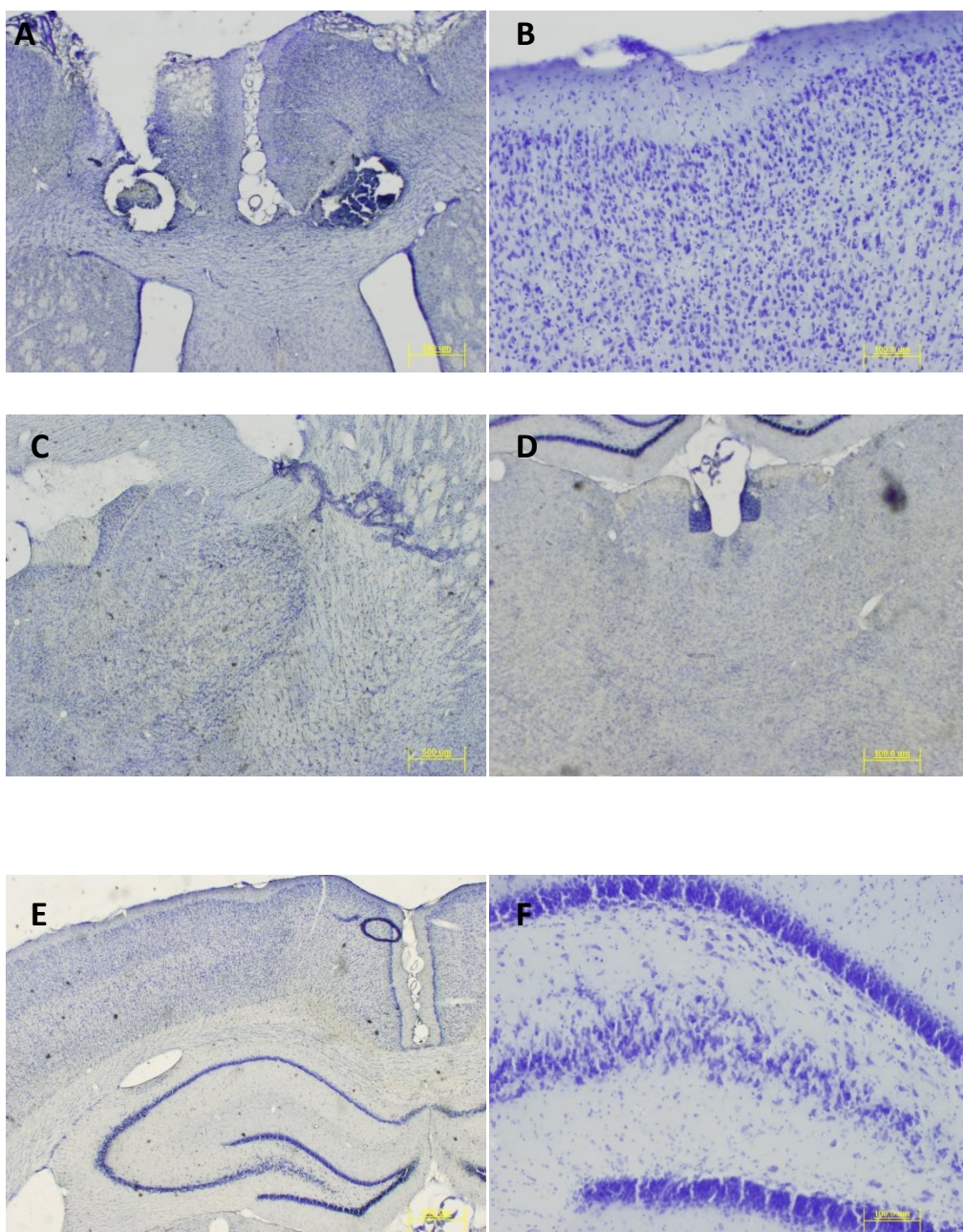
Vyvolání epileptického statu

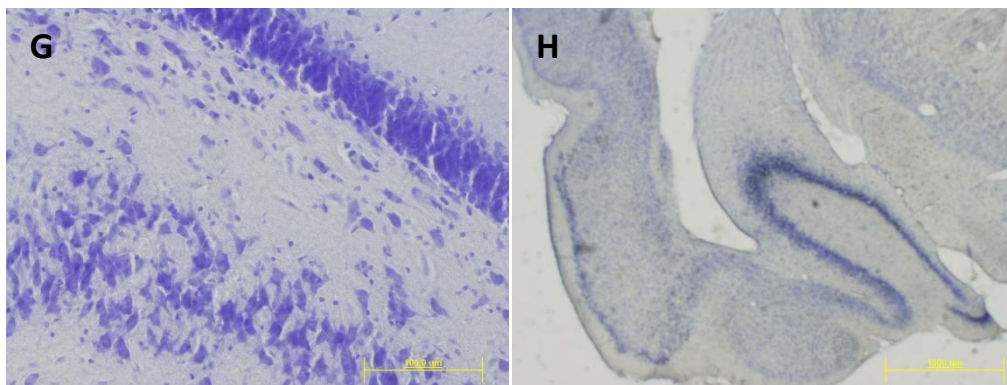
Jako inzult vyvolávající rozvoj epilepsie jsme zvolili chemicky vyvolaný SE u dospělého potkana pomocí intracerebroventrikulární aplikace 4-AP. Během stereotaktické aplikace 20nmol koncentrace 4-AP bylo zvíře v isofluoranové anestezii. Po ukončení anestezie byla zvířata samostatně umístěna do plastových boxů, kde začala být aktivní přibližně po 15 minutách po ukončení anestezie. Rozvoj epileptického záchvatu jsme pozorovali přibližně po 25 minutách po ukončení anestezie. Pro porovnání míry epileptické aktivity jsme použili modifikovanou Racinovu (Racine, 1972) stupnici a z pokusu jsme vyřadili zvířata, která nedosáhla 4. - 5. stupně Racinovi stupnice s minimálním přetrváváním záchvatu po dobu nejméně 1,5 hodiny. Z experimentu byla tímto způsobem vyřazena 4 zvířata s nedostatečnou mírou záchvatu (Racine < 4), která byla způsobena zamražením 4-AP a tím poklesem jeho účinnosti.

Záchvatová aktivita se projevovala nejprve výskytem automatismů (žvýkání, čišťení, "wet dog shakes"), poté klonické pohyby jedné přední (hrudní) končetiny s postupným rozvojem bilaterální aktivity. Další fáze záchvatů spočívala v tonických záchvatech svalů šíje později i trupu, které postupně gradovali a zvíře se stavilo na zadní (pánevní) končetiny provázeno s výraznou klonickou aktivitou předních končetin, mimických a žvýkacích svalů. U většiny zvířat se záchvatovou aktivitou se do 30 minut po ukončení anestezie objevil stupeň 5 dle Racina, který je charakteristický pády ze vzpřímené polohy. Záchvaty do 3. stupně Racinovy škály byly přerušeny krátkým obdobím bez zjevné motorické záchvatové aktivity (s výjimkou zjevně patologických pohybů vousy). Epileptická aktivita nad 3. stupeň byla již kontinuální bez behaviorálních známek přerušení minimálně po dobu 60minut. Následně docházelo opět k přerušení aktivity s postupným prodlužováním interval mezi záchvaty. Úmrtnost zvířat po SE (do 7 dní od indukce SE) byla 15% celkového počtu zvířat.

Vyhodnocení morfologického a imunohistochemického barvení

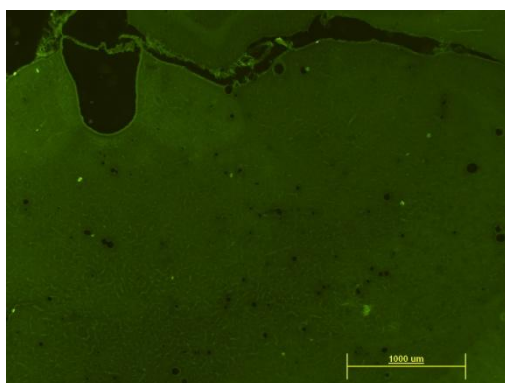
Pro vyhodnocení míry poškození mozkové tkáně a k určení aktivace mikroglie jsme zvolili 3 časové intervaly od aplikace 4-AP (3 dny, 9 dní a 28 dní). Pro ověření správného umístění kanyl bylo využito morfologické barvení podle Nissla. Toto barvení bylo použito i v další části tohoto projektu, který dále pokračuje chronickou skupinou zvířat po 4-AP. U těchto zvířat jsou předpokládány spontánní epileptické záchvaty, které mohou vést k morfologickým abnormalitám. Pro zjištění těchto dlouhodobých strukturních změn v tkáni je Nisslovo barvení velmi vhodné. Zde bych rád uvedl ukázkou barvení podle Nissla.



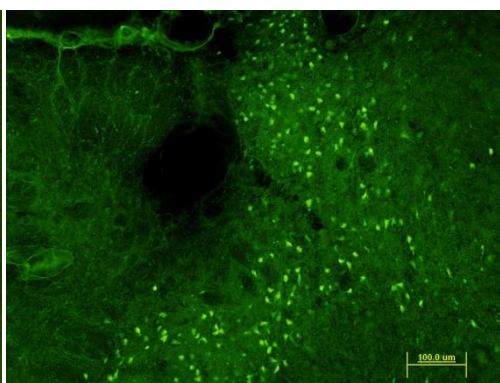


Míru poškození mozku po epileptickém statu jsme porovnávali pomocí FluoroJade B barvení, který se s vysokou specifitou váže na nevratně poškozené neurony (Schmued et al., 1997). FluoroJade B je anionický derivát fluoresceinu, který je excitován v modrém spektru při vlnové délce 495 nm, a emituje v zeleném spektru o vlnové délce 521 nm.

nepoškozená tkáň



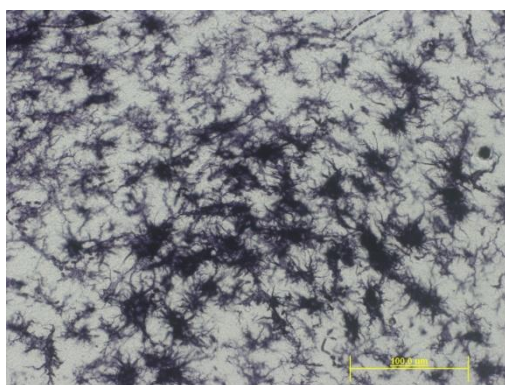
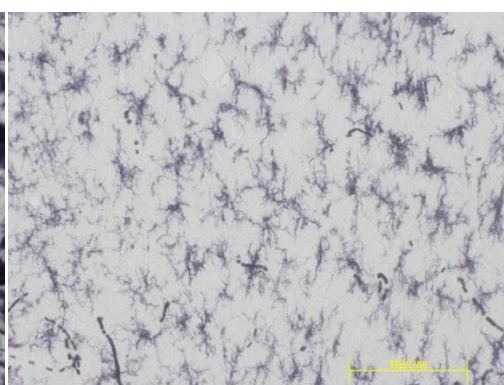
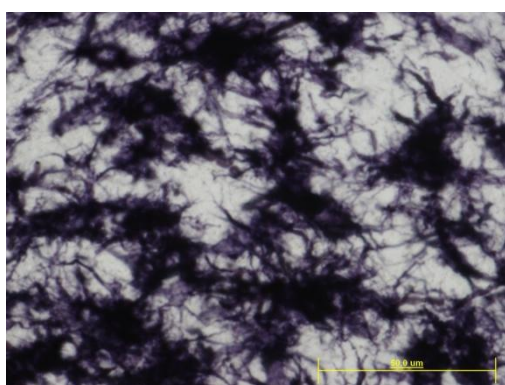
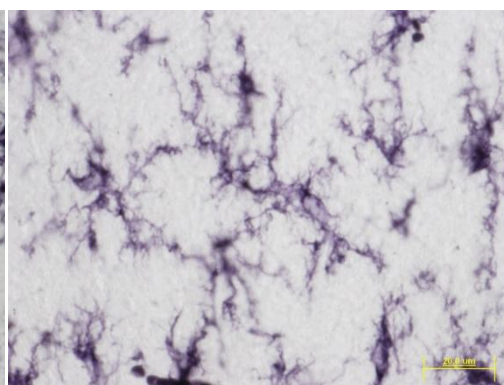
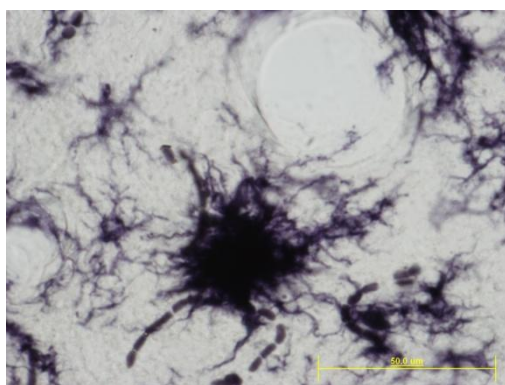
degenerující neurony



Pro analýzu míry aktivace mikroglie bylo použito imunohistochemické barvení s markerem CD11b. Na řezech byly pozorovány CD11b pozitivní buňky. Velmi slabě byly nabarveny perzistující mikroglie, které mají jen velmi slabou expresi CD11b. Mimo jiné jsou specifické výrazně vláknitým tvarem buňky. Velmi výrazně se barvily aktivované mikroglie, které přestávají mít vláknitou strukturu a začínají mít výrazně objemnější soma buňky, tj. zakulacují se. Aktivované mikroglie se na rozdíl od perzistujících buněk ve tkáni výrazněji pohybují a stahují se do místa poškození, či směrem po chemokinovém gradientu.

Aktivované mikroglie

Perzistující mikroglie



Pro ukázkou barvení FJB a CD11b jsem vybral vždy 3 zvířata, kde jedno po aplikaci PBS sloužilo jako kontrola a dvě další byla zvolena tak, aby byla vidět různá míra poškození tkáně a aktivace mikroglíí.

3.den po aplikaci

U kontrolního mozku LB16, který byl odebrán 3. den po aplikaci PBS, nejsou vidět FJB pozitivní buňky. To značí že ve tkáni nedochází k odumírání neuronů. Na snímcích A,B,C,D,E,F jsou ukázány vybrané struktury, u kterých jsme zjišťovali poškození a aktivaci mikroglie (thalamus, kortex, hipokampus, bazální ganglia, amygdala a detail hipokampu. U tohoto zvířete nedochází k aktivaci mikroglie.

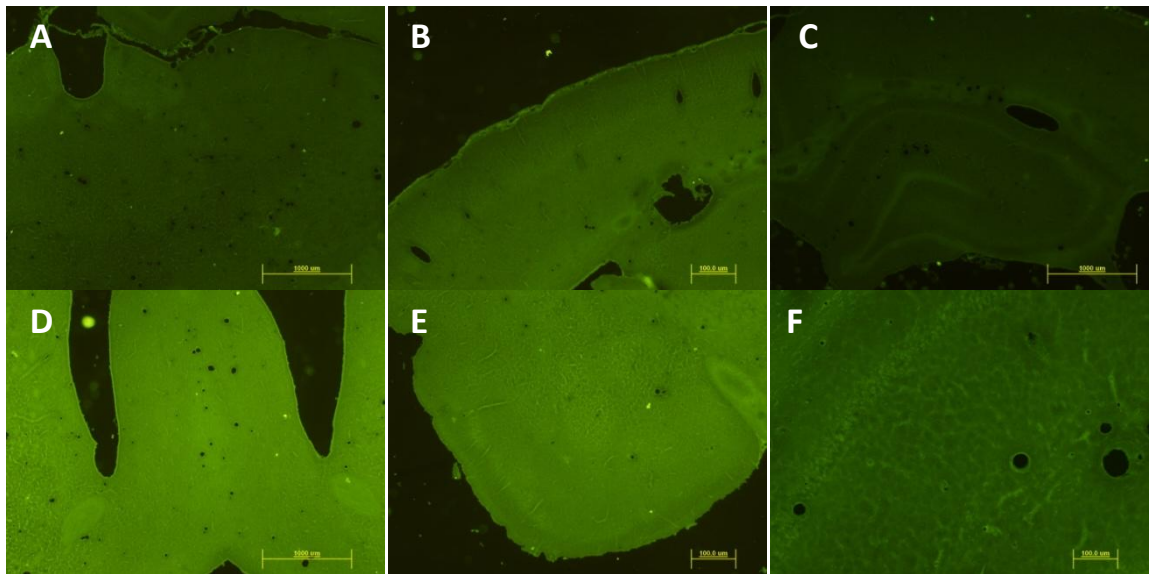
Oproti tomu zvířata 3.den po aplikaci 4-AP vykazují poškození neuronů a aktivaci mikroglíí. U mozku ze zvířete LB1 můžeme pozorovat výrazné poškození v oblasti thalamu (obr. A) a aktivaci v oblasti thalamu (obr. D) a v detailu poškození a aktivace (obr. B, E). Dále je na obrázku vidět značené pomocí FJB poškozené neurony v oblasti bazálních ganglií v pravé hemisféře -0,26 mm od bregmy, (obr. C) a aktivaci v oblasti bazálních ganglií -1,4 mm od bregmy.

U zvířete LB39 je vidět masivní poškození v oblasti senzomotorické kůry v II. a III. vrstvě a v nižších vrstvách kůry dále přetrvávají izolované negenerující neurony (obr. A) a s tímto poškozením souvisí aktivace mikroglíí ve stejné oblasti (obr. D). V oblasti hipokampu je vidět poškození lokalizované v oblasti CA1 (obr. B a detail obr. C). Aktivace mikroglíí v hipokampu odpovídá lokalizaci poškození, ale aktivované mikroglie lze vidět i v oblasti gyrus dentatus. Výrazná neurodegenerace je vidět v oblasti bazálních ganglií a amygdaly (obr. F, G), kde je také velmi výrazná aktivace mikroglíí (obr. CH, I). Poškození a aktivace byla pozorována také v oblasti celého thalamu, a to i přes mírně nižší koncentraci aktivovaných mikroglíí a negenerujících neuronů (obr. H, J).

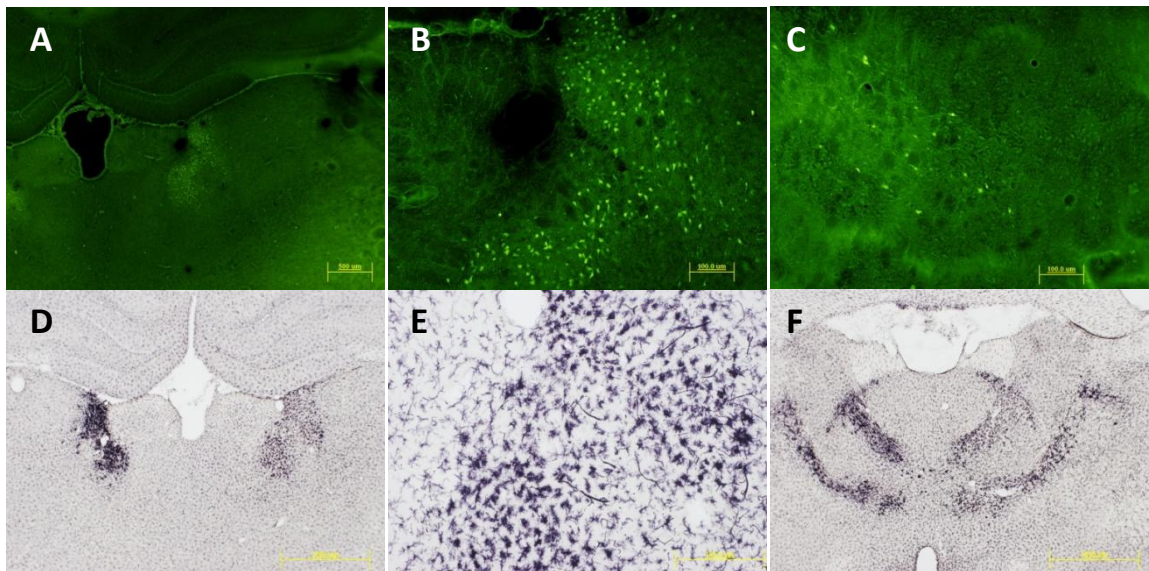
Pro srovnání jsem přidal ukázkou zvířete, které jsem musel vyřadit z pokusu po podání zamražené dávky 4-AP. Mozek byl odebrán 3. den po aplikaci 4-AP. Zvíře bylo vyřazeno pro nedostatečnou sílu záchvatu podle Racinovi škály a také pro krátký čas trvání epileptického záchvatu (45 minut). Na FJB barvení nejsou vidět žádné degenerující neurony (obr. A, B) a ani

žádná vyšší míra aktivace mikroglíí. I přes jistou epileptickou aktivitu je mozek srovnatelný s kontrolní skupinou.

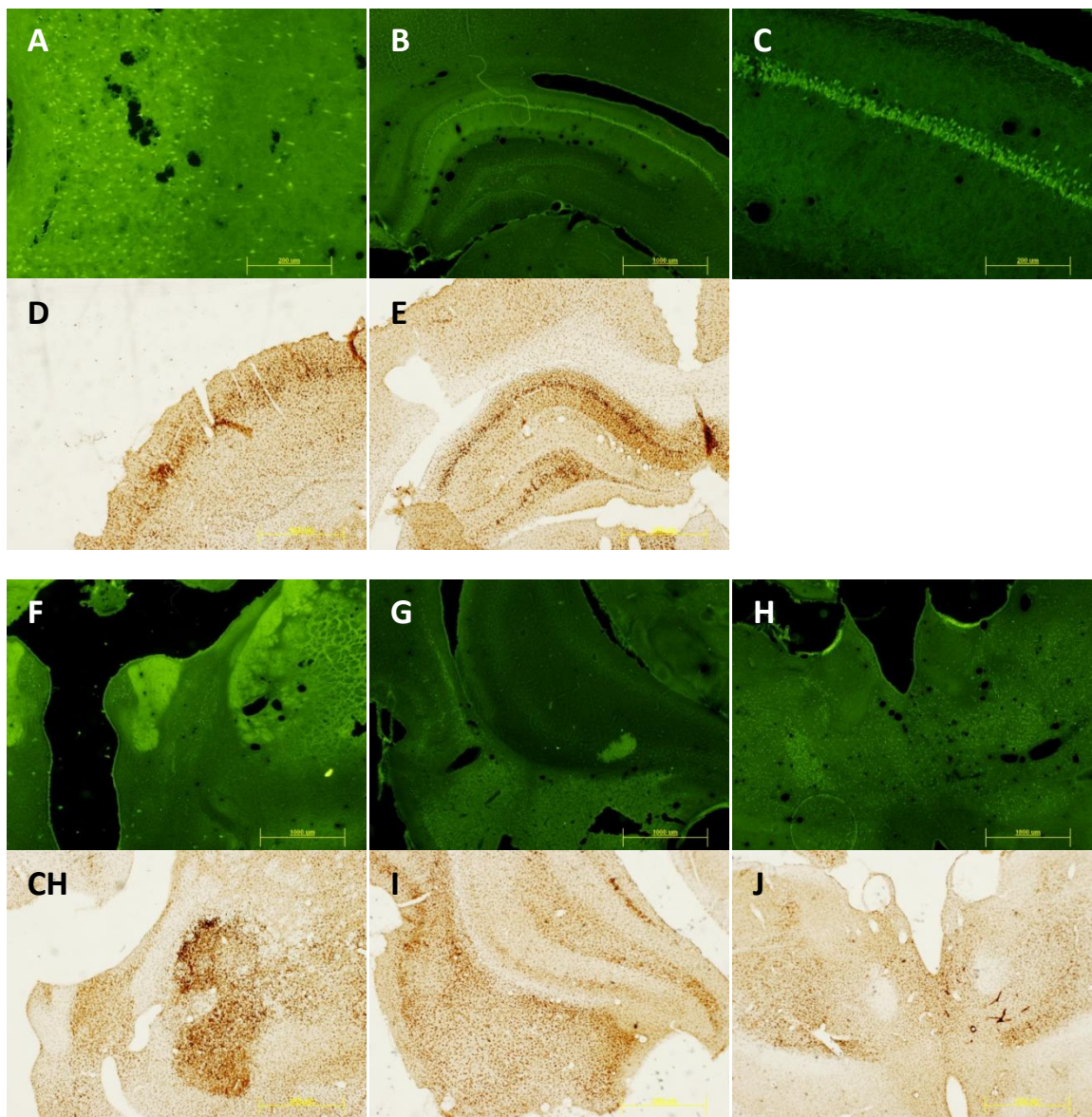
3. den po aplikaci PBS (LB16)



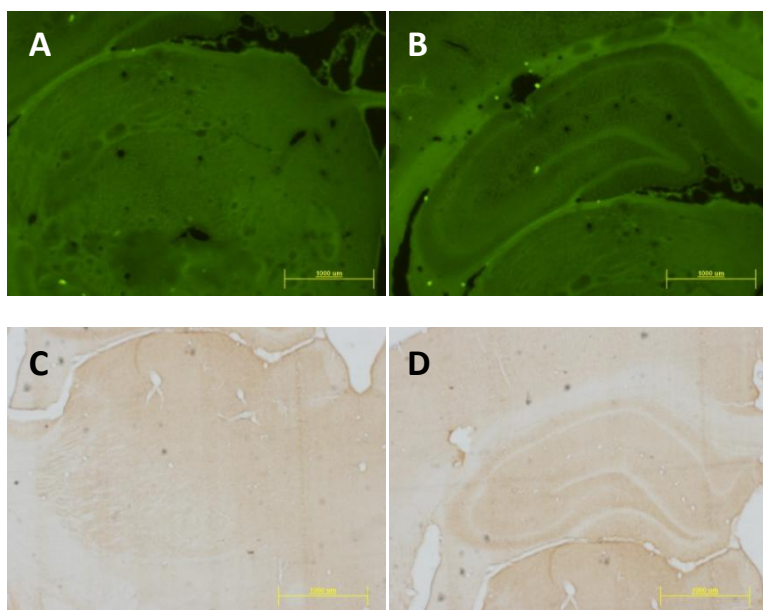
3. den po aplikaci 4-AP (LB1)



3. den po aplikaci 4-AP (LB39)



LB11 ukazka po zmražení 4-AP



9. den po aplikaci

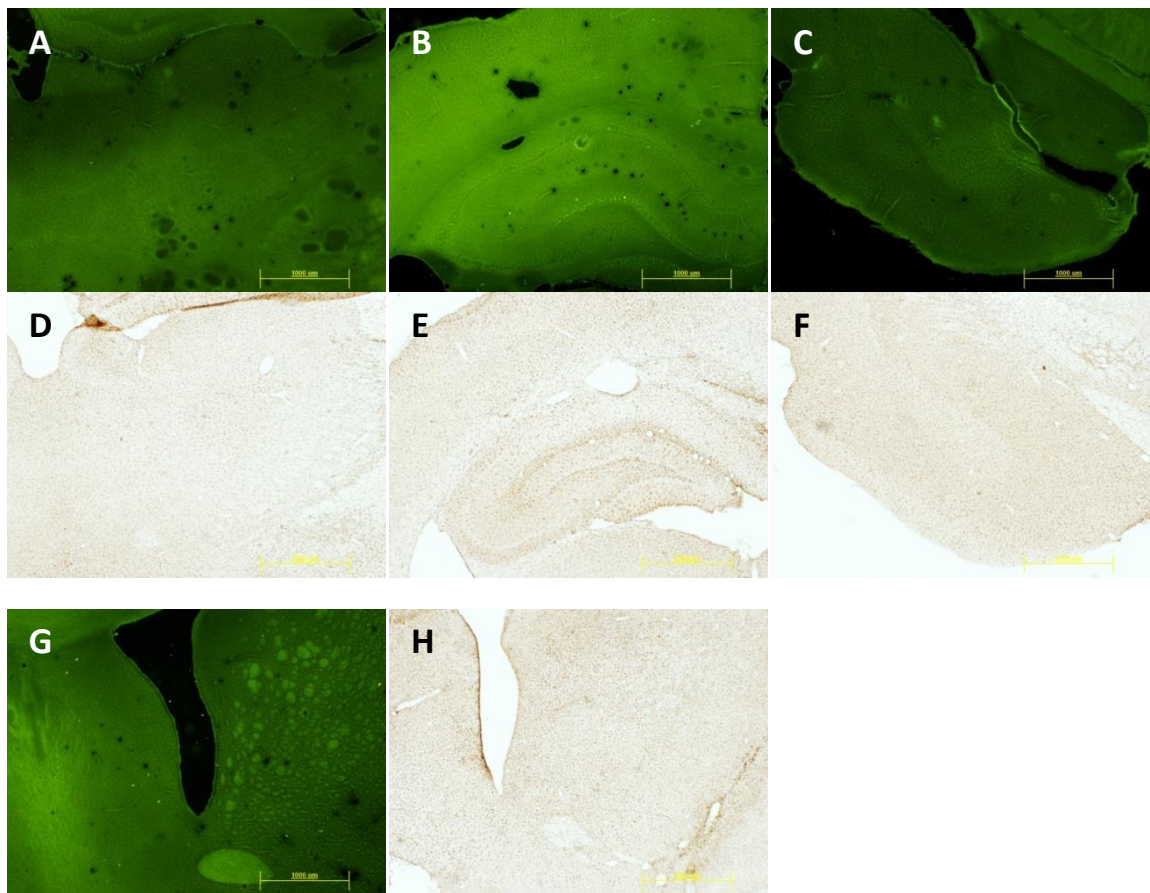
V kontrolním mozku zvířete LB28 není vidět po 9-ti dnech od aplikaci PBS žádné poškození a ani aktivace mikroglíí. Pro ukázkou jsem zvolil FJB barvené stuktury: talamus (obr. A), hipokampus (obr. B), amygdala (obr. C) a bazální ganglia (obr. G) a tomu odpovídající barvení CD11b, které značí aktivované mikroglie: talamus (obr. D), hipokampus (obr. E), amygdala (obr. F) a bazální ganglia (obr. H).

Po aplikaci 4-AP bylo 9. den u mozku LB2 pozorováno výrazné poškození v oblasti amygdaly (obr. A a detail obr. B) , v oblasti bazálních ganglií (obr. C), a v oblasti talamu (obr. F detail obr. G). Po SE byla 9. den po aplikaci 4-AP pozorována aktivace mikroglíi v oblasti amygdaly, která odpovídala barvení na FJB (obr. D), aktivace také byla velmi výrazná v oblasti bazálních ganglií (obr. D). Velká aktivace mikroglie byla pozorována v talamu (obr. CH). Výrazná aktivace mikroglíi byla pozorována v oblasti neocortexu, nejspíše jako následek průchodu kanyl do komor(obr. H, I). V této oblasti však nebyly detekovány skoro žádné FJB pozitivní neurony.

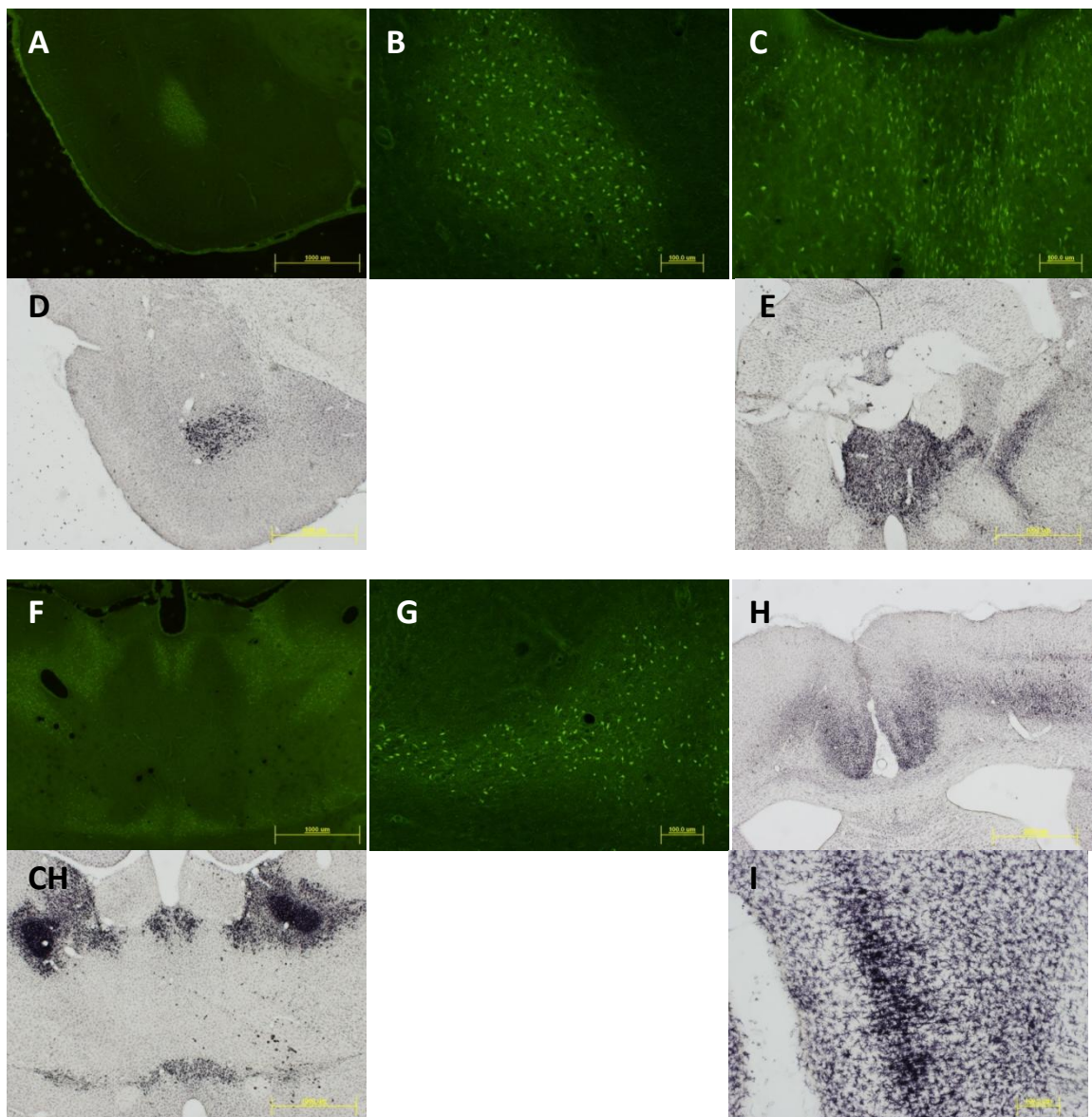
U mozku LB23 bylo pozorováno poškození v hipokampu (obr. A) v oblasti CA1 a masivní aktivace mikroglíí v okolí (obr. C a v detailu B). Masivní poškození neuronů (obr. I, detail J, K) a masivní aktivace mikroglíí (obr. L) byla pozorováno také v oblasti talamu.

Degenerující neurony jsme pozorovali také v oblasti bazálních ganglií (obr. D, E). S jejich poškozením souvisela aktivace mikroglíí v oblasti (obr. G, H). Oproti těmto velkým poškozením bylo zaznamenáno také menší poškození amygdaly (obr. F) stejně lokalizovaná aktivace mikroglíí (obr. CH)

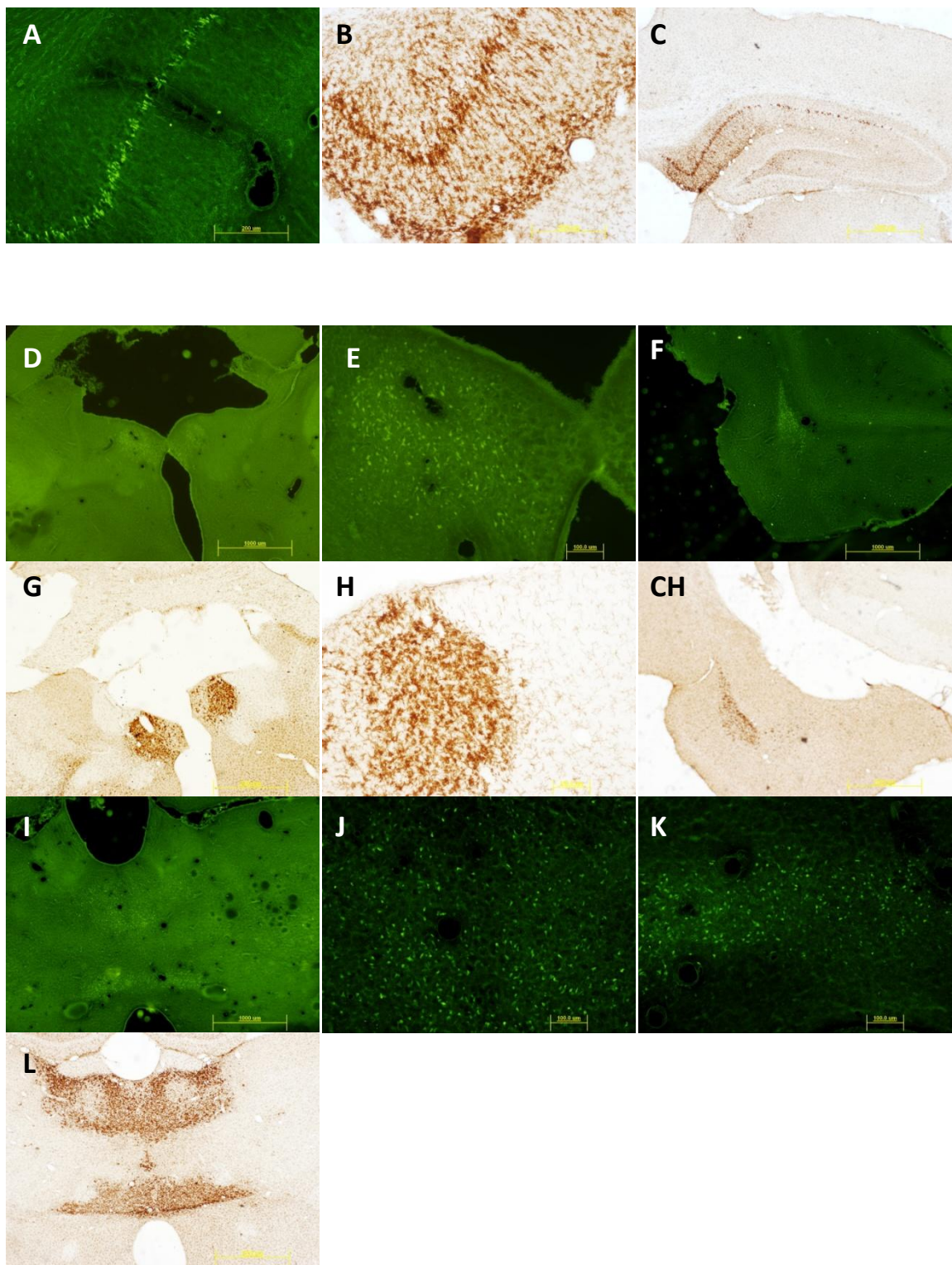
9. den po aplikaci PBS (LB28)



9. den po aplikaci 4-AP (LB2)



9.den po aplikaci 4-AP (LB23)



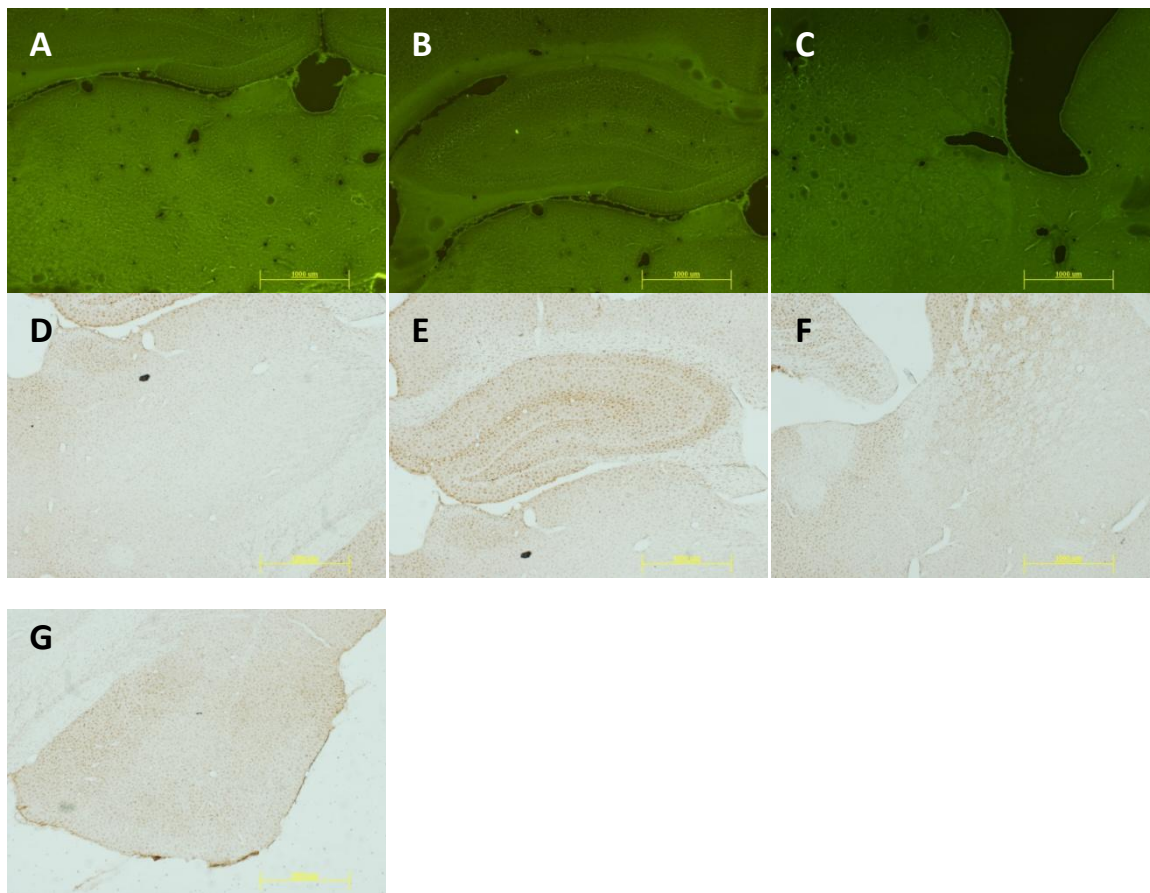
28.den po aplikaci

U mozků, které byly odebrány 28. den po aplikaci, jsme v případě kontrol nepozorovali žádné FJB značené degenerující neurony viz. mozek zvířete LB35. Zde jsme nepozorovali žádné poškození ani aktivaci v oblasti talamu (obr. A, D), v hipokampu (obr. B, E), ani v oblasti bazálních ganglií (obr. C, F). V oblasti amygdaly také nebyla pozorována žádná aktivace mikroglíí (obr. G).

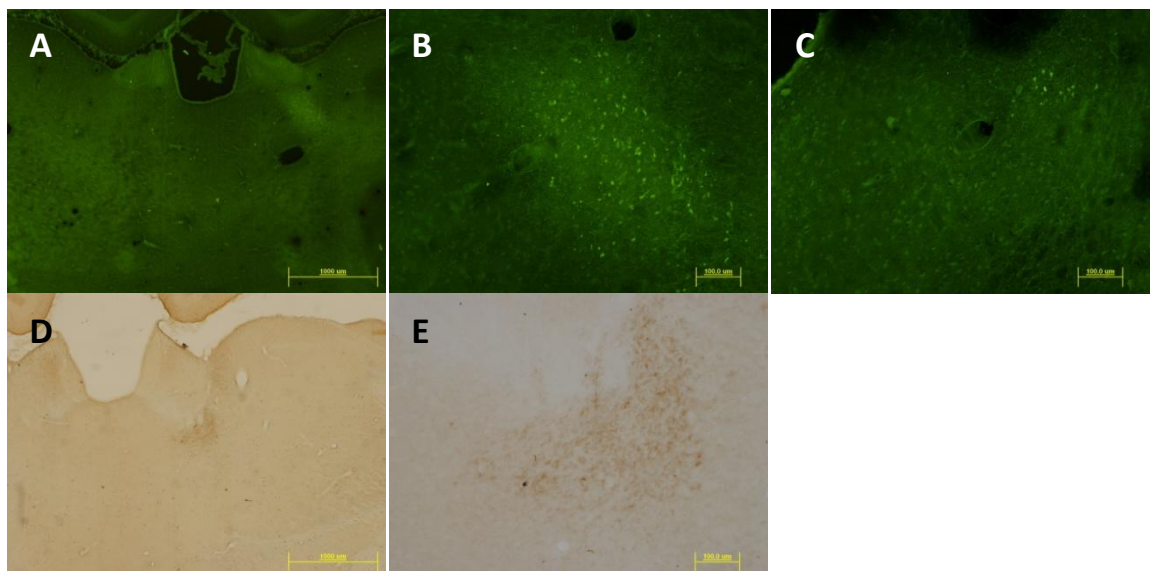
U zvířete LB5 jsme 28. den po aplikaci 4-AP pozorovali menší poškození (obr. A, detail B) v oblasti talamu a shodně lokalizovanou slabou aktivaci mikroglíí (obr. D, detailně E).

U zvířete LB41 oproti zvířeti LB5 byl vidět obrovské množství degenerujících neuronů v oblasti talamu (obr. H, detailně CH) a s tím související masivní aktivaci mikroglíí v talamu (obr. J). Poškozena byla také oblast bazálních ganglií (obr. C) s aktivovanými mikroglíemi (obr. F). Poškození menšího rozsahu bylo pozorováno v oblasti amygdaly a okolní piriformní a entorinální kůry (obr. A, G), s odpovídajícím rozsahem aktivace mikroglíí (obr. D, I). Menší poškození bylo také pozorováno v oblasti hipokampu (obr. B), v této oblasti byla oproti poškození výrazně zvýšená plocha aktivovaných mikroglíí (obr. E). Také bylo zaznamenáno poškození v oblasti nižší korové vrstvy (obr. K).

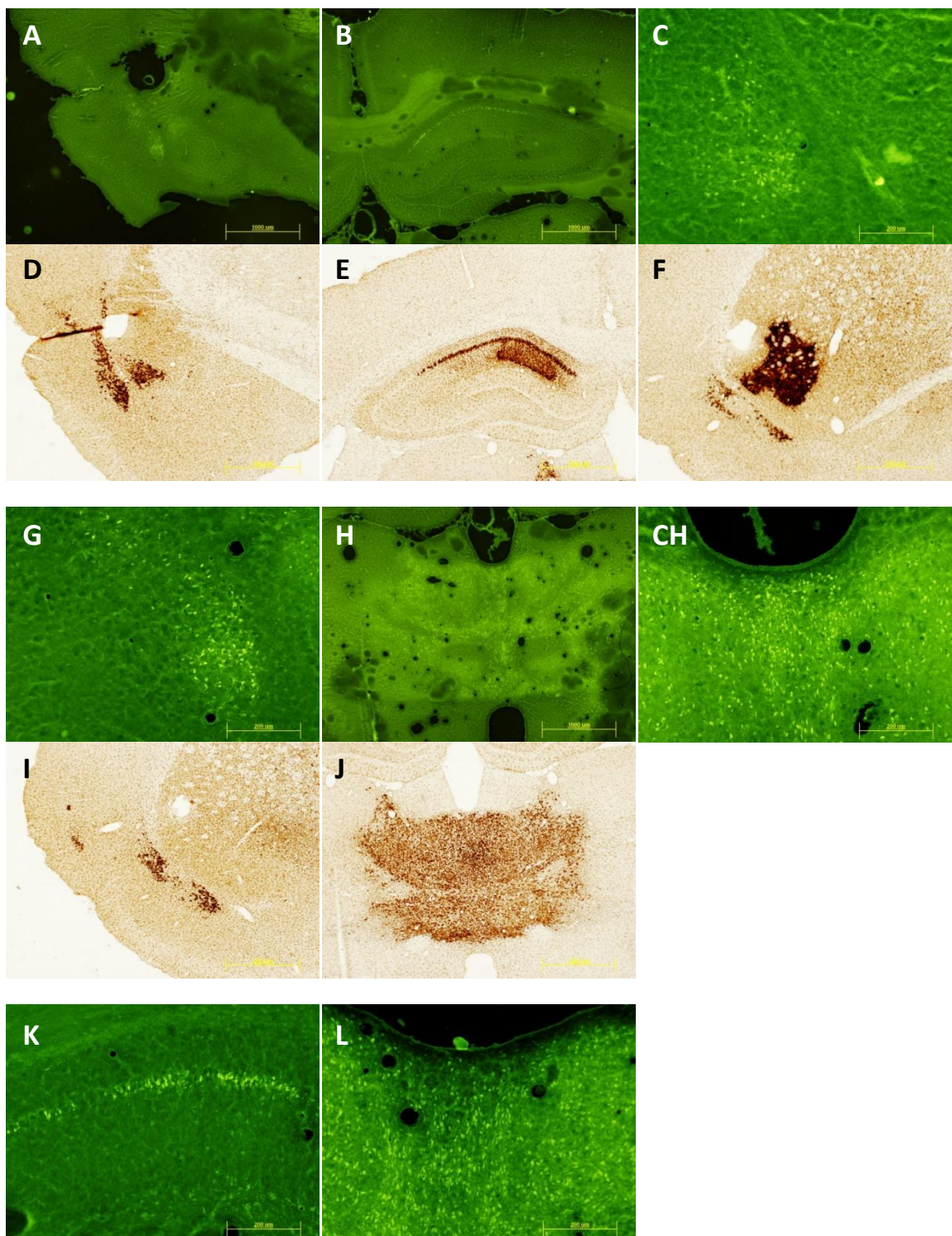
28. den po aplikaci PBS (LB35)



28. den po podání 4-AP (LB5)



28. den po podání 4-AP (LB41)



Výsledek imunohistochemického barvení

Naše výsledky ukazují výrazný neurodegenerativní vliv intracerebroventrikulární aplikace 4-AP oproti kontrolním zvířatům ($p < 0,01$), kterým byl do komor podán stejný objem PBS (viz. Graf 4). Mimo jiné, kontrolní zvířata ve sledovaných intervalech nevykazovali žádnou změnu v úrovni aktivace mikroglíí, oproti tomu potkani po aplikaci 4-AP vykazovali zvýšený rozsah oblastí s aktivovanými mikroglíemi (viz. Graf 4). Tyto oblasti velmi výrazně kopírovaly oblasti s neurodegenerací, navíc parametry rozsahu poškození a úrovně aktivace mezi sebou pozitivně korelovali 9. a 28. den po SE ($r = 0,975$; $p = 0,016$ (9. den) a $r = 0,900$; $p = 0,083$ (28. den) (viz. Graf 4)).

Při pohledu na časovém rozložení, nejvýraznější rozsah neurodegenerujících neuronů a aktivovaných mikroglíí v rámci celého mozku byl 3. den po aplikaci 4-AP (viz. Graf 4). Se zvyšujícím odstupem po SE (9. den) byla prokazatelná tendence k poklesu celkového počtu degenerujících neuronů ($p = 0,067$) (viz. Graf 4), který se dále neměnil a zůstal téměř stejný i 28 dnů po aplikaci 4-AP ($p = 0,064$). Obdobné časové rozložení bylo zjištěno v ubývání míry aktivovaných mikroglíí od 3. dne do 28. dne, které však nebylo prokazatelně signifikantní (viz. Graf 4).

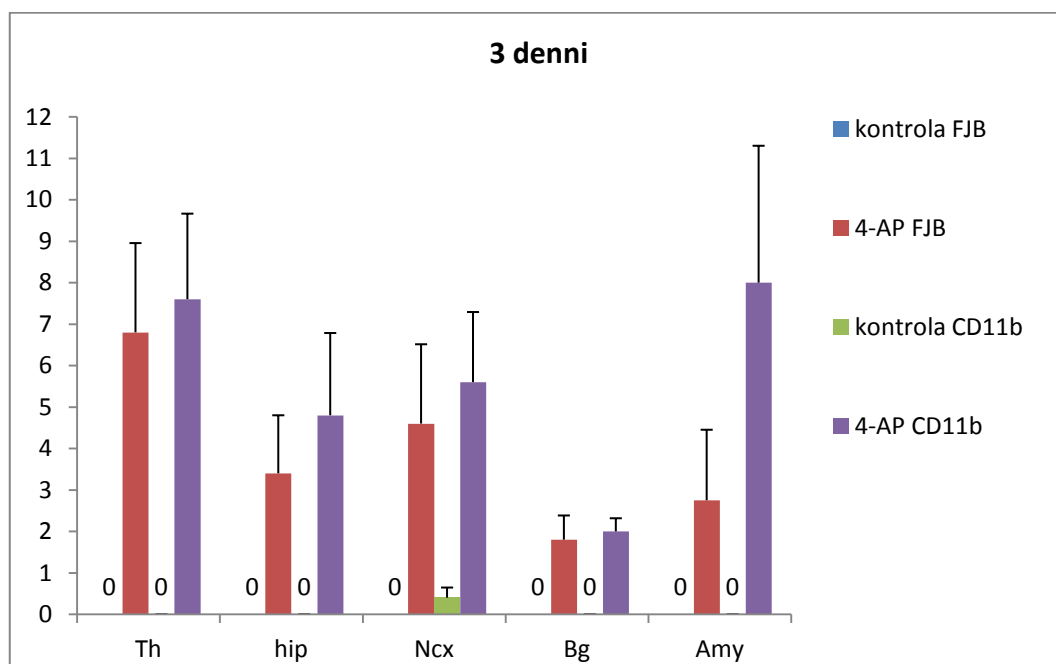
Rozložení degenerujících neuronů a aktivovaných mikroglíí bylo sledováno v 5-ti mozkových strukturách, vybraných na základě zkušenosti s předchozími modely a také předběžného zhodnocení poškození. Nejvýraznější poškození bylo třetí den po SE ve všech zvolených strukturách mozku (thalamus, hipokampus, neocortex, bazální ganglia a oblast amygdaly s piriformní kůrou a entorinální kůra). Největší míra poškození byla zjištěna v thalamu, střední míra poškození pak v neocortexu, hipokampu a nejnižší poškození jsme evidovali v amygdale a bazálních gangliích (viz. Grafy 1,2,3).

Zatímco poškození thalamu bylo evidentní i dalších intervalech po SE (9. a 28. den), v dalších sledovaných strukturách míra poškození razantně klesala. Tento pokles byl největší devátý den (viz. Graf 2), především pro hipokampus a neocortex. V intervalu 28 dní po 4-AP jedinou poškozenou strukturou mimo thalamus byla bazální ganglia (viz. Graf 3). Tento úbytek míry degenerujících neuronů s odstupem po SE byl signifikantní pouze v případě neocortexu ($p < 0,05$).

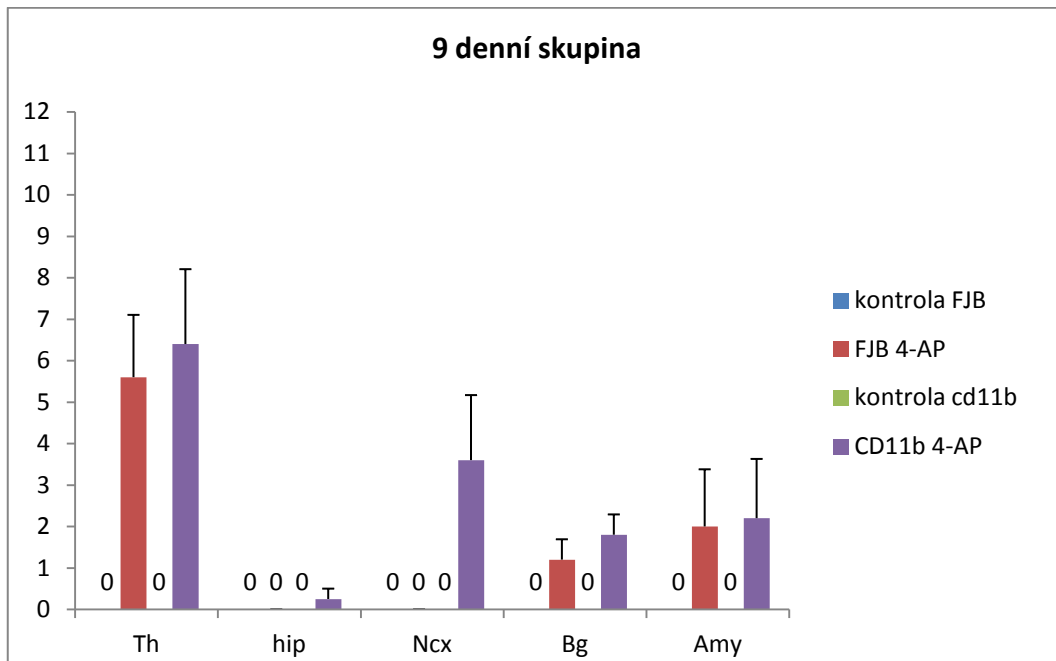
Zatímco aplikace 4-AP vede k aktivaci mikroglíí, toto zjištění se netýká kontrolních skupin zvířat ($p < 0,01$). Míra aktivace mikroglíí byla nejvyšší třetí den po aplikaci 4-AP a to ve všech sledovaných strukturách (viz. Graf 1). Nejvýraznější aktivace mikroglíí byla v oblasti amygdaly a talamu, mírnější v oblasti hipokampu a neocortexu a nejnižší v oblasti bazálních ganglií.

Zatímco tato míra aktivace mikroglíí korespondovala s rozsahem poškození pro celý mozek, strukturálně byly nalezené odlišnosti, především vyšší míra aktivace v oblasti amygdaly třetí den po SE (viz. Graf 1). Rozdíl byl také nalezen v intervalu 9 dní po 4-AP, přestože v tomto intervalu již nebyla evidována žádná degenerace neuronů v oblasti neocortexu a hipokampu, nicméně byly nalezeny aktivované mikroglie v těchto regionech (viz. Graf 2). Míra aktivace mikroglíí s časem výrazně klesala a zjistili jsme signifikantní pokles mezi 3. a 28. dnem v neocortexu ($p < 0,05$) a obdobný trend jsme zaznamenali v oblasti amygdaly ($p = 0,072$) (viz. Grafy 1,2,3).

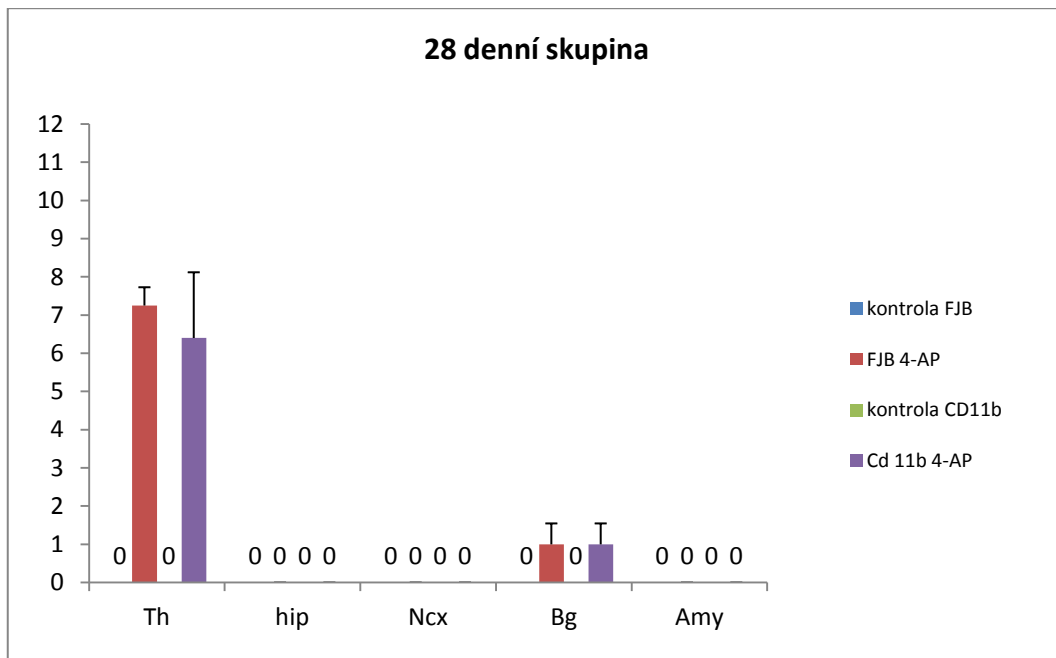
Graf 1



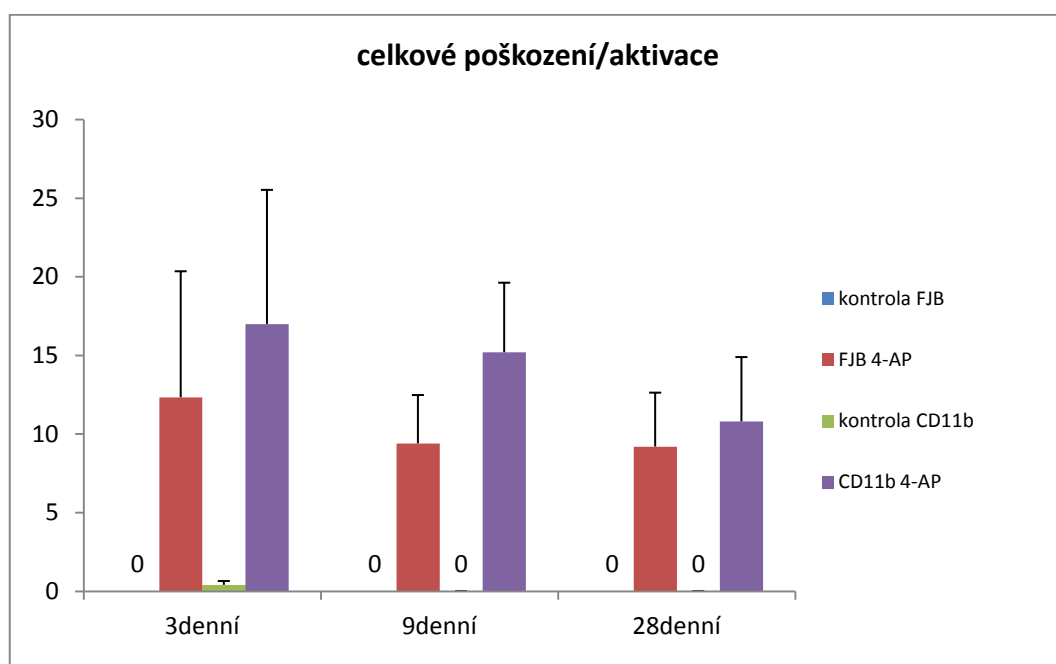
Graf 2



Graf 3



Graf 4



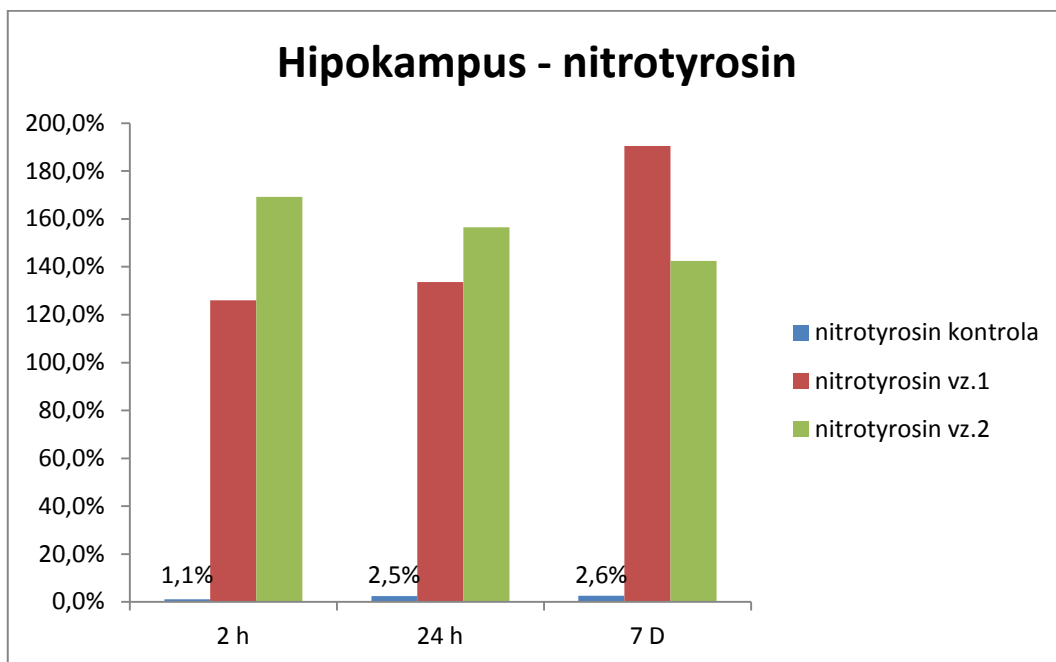
Vyhodnocení imunoblot

Pomocí metody imunoblot jsme kvantifikovali oxidativní stres v průběhu a po skončení SE. Jako marker oxidativního stresu jsme zvolili 3-nitrotyrosin, který vzniká nitrací tyrosinu pomocí peroxinitritu. Peroxinitrit je během tvořen při současné produkci superoxidu a oxidu dusnatého. Za běžných fyziologických podmínek je produkce superoxidu a dusíkatých radikálů odstraňována pomocí ochranných antioxidačních systémů, jako superoxiddismutáza (SOD), nebo glutathionperoxidazový systém. Oxid dusnatý je za fyziologických podmínek velmi rychle vychytáván hemoglobinem, případně reaguje se superoxidem na peroxinitrit a je odstraňován pomocí SOD. Pro stanovení míry oxidativního stresu byly zvoleny 3 intervaly (2 hodiny, 24 hodin, 7 dní od prvních epileptických záchvatů po ukončení anestezie). Tyto hladiny jsem měřil v rámci diplomové práce v hipokampu a senzorimotorické kůře, nicméně probíhalo a probíhá kvantifikace některých dalších proteinů a oxidativního stresu pomocí imunoblotu ještě ve struktuře mozečku, mezimozku a hemisféry.

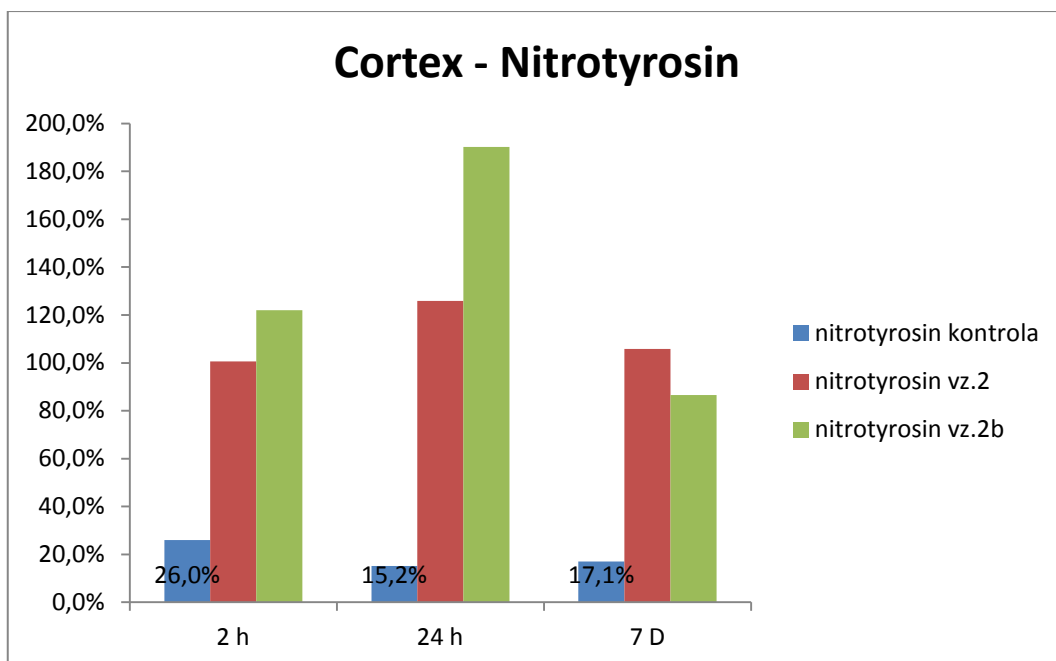
U kontrolních zvířat se ve sledovaných intervalech neprojevil žádný nárůst produkce nitrotyrosinu v oblasti hipokampu. Oproti tomu u zvířat po aplikaci 4-AP došlo k masivnímu nárůstu oxidativního stresu již po 2 hodinách epileptické aktivity. Tato vysoká míra nitrotyrosinu přetrvávala ve stejné úrovni v oblasti hipokampu po všechny časové intervaly. Data byla normalizovaná vůči β -aktinu, tj. 100 % se rovná síle signálu β -aktinu ve vzorku (viz. Graf 5).

V oblasti senzorimotorické kůry byla hladina nitrotyrosinu u kontrol vyšší než v oblasti hipokampu. V intervalu 2 hodin od zahájení SE byl zaznamenán masivní nárůst nitrotyrosinu, který ještě mírně stoupal v intervalu 24 hodin a po sedmi dnech již byl znát mírný pokles (viz. Graf 6).

Graf 5



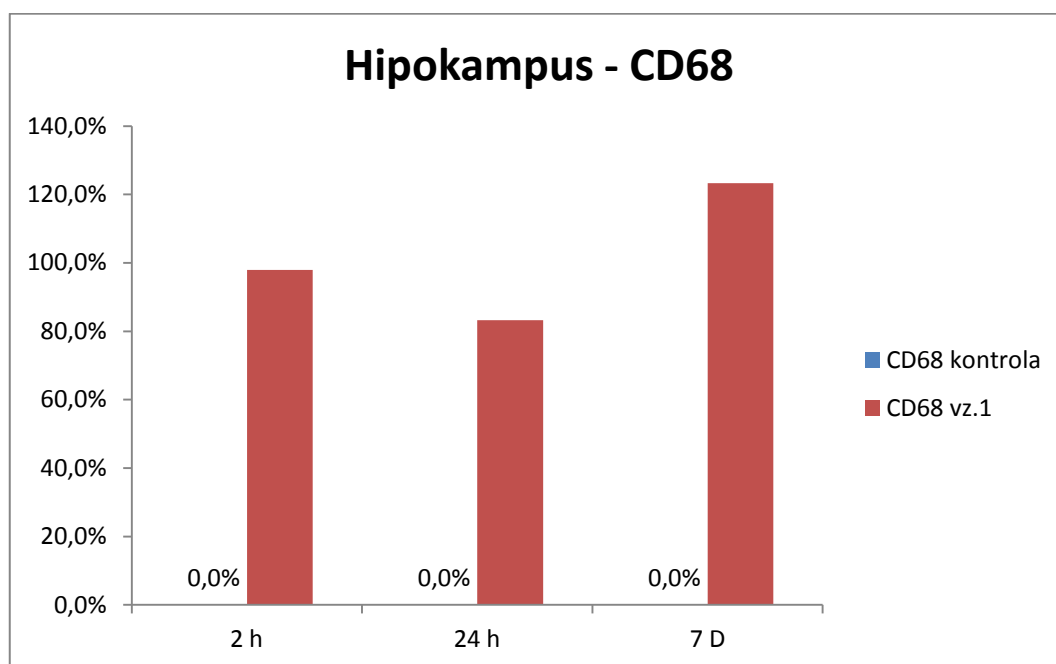
Graf 6



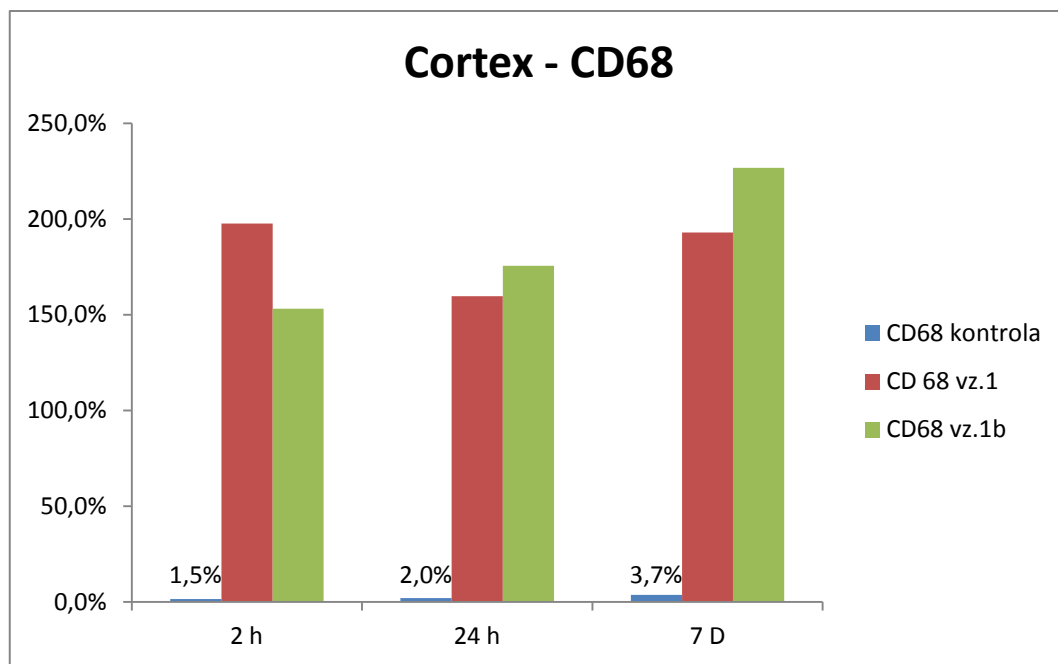
Při stanovení markeru aktivovaných mikroglíí CD68 jsme v případě hipokampu nezaznamenali i přes opakované měření u kontrol žádný výskyt CD68. V intervalu 2 hodiny po začátku epileptického záchvatu jsme již naměřili výrazný nárůst CD68, který přetrvával po všechny sledované intervaly (viz. Graf 7).

V případě senzomotorické kůry se koncentrace CD68 u kontrol pohybovala mezi 1 % - 4 %. Po 2 hodinách od začátku SE došlo opět k masivnímu nárůstu CD68 jako v případě hipokampu. Tento nárůst opět přetrvával po celé sledované období (viz. Graf 8).

Graf 7

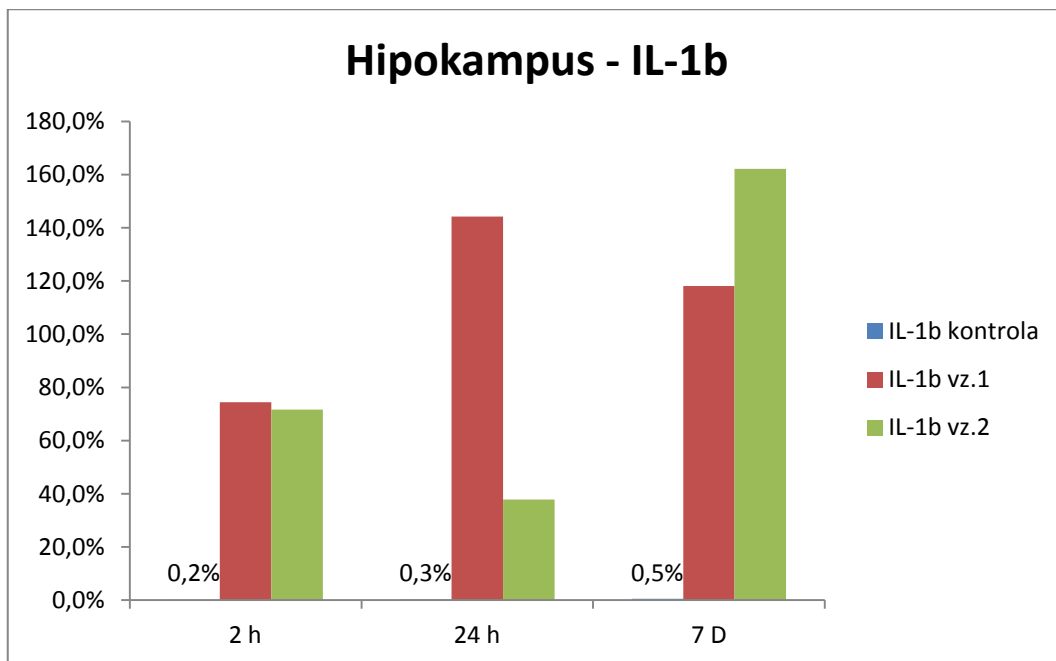


Graf 8

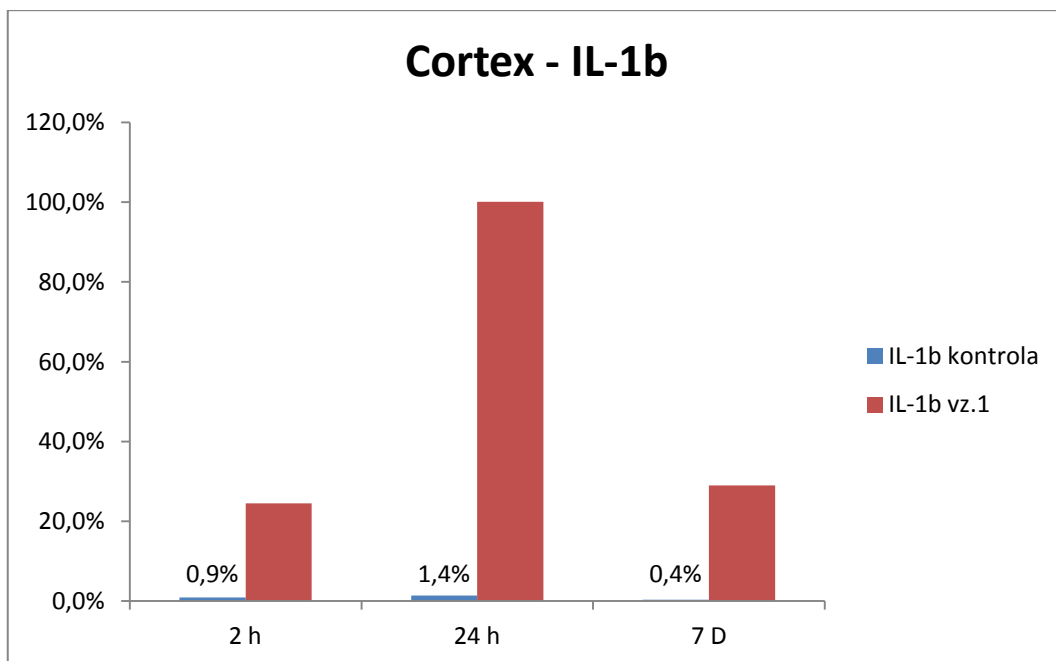


Produkce IL-1b byla v oblastech hipokampu (viz. Graf 9) a senzorimotorické kůry (viz. Graf 10) v případě kontrol nízká. Dosahovala od 0,2 % - 1,4 %. Nejvyšší produkce IL-1b byla v intervalu 24 hodin od začátku epileptické aktivity. Nicméně nárůst IL-1b se projevil již po 2 hodinách od začátku epileptické aktivity.

Graf 9



Graf 10



Behaviorální testy

Pro zjištění vlivu epileptického statu vyvolaného 4-AP u dlouhopřežívajících zvířat jsme využili skupinu zvířat v chronickém experimentu pro ověření výskytu spontánních záchvatů. Zvířata jsme testovali 8 měsíců po aplikaci 4-AP pomocí série behaviorálních testů. Pro zjištění možného poškození motorických funkcí jsme zvolili motorické testy Rotarod a Ladder test. Pro zjištění možného poškození ventrálního thalamu a amygdali jsme testovali anxieta a lokomoční aktivitu v habituačním testu Open-field. Možné poškození hipokampu jsme ověřovali pomocí testu na prostorovou paměť a učení v Morrisově vodním bludišti (MWM).

V rotarod testu, který je testem motoriky a rovnováhy jsme měřili dobu, po kterou je potkan schopen se udržet na otáčejícím se válci (max. doba testování byla 2 minuty), test jsme opakovali s každým zvířetem 4 krát a vždy na vyšší rychlost otáčení válce. V tomto testu se zvířata po aplikaci 4-AP nelišili v době strávené na otáčejícím se válci od kontrolních zvířat. A to při žádné z použitých rychlostí pro testování (viz. Graf 11). Výsledek tohoto testu poukazuje na zachovanou funkčnost v oblastech motorického kůry, bazálních ganglií a mozečku.

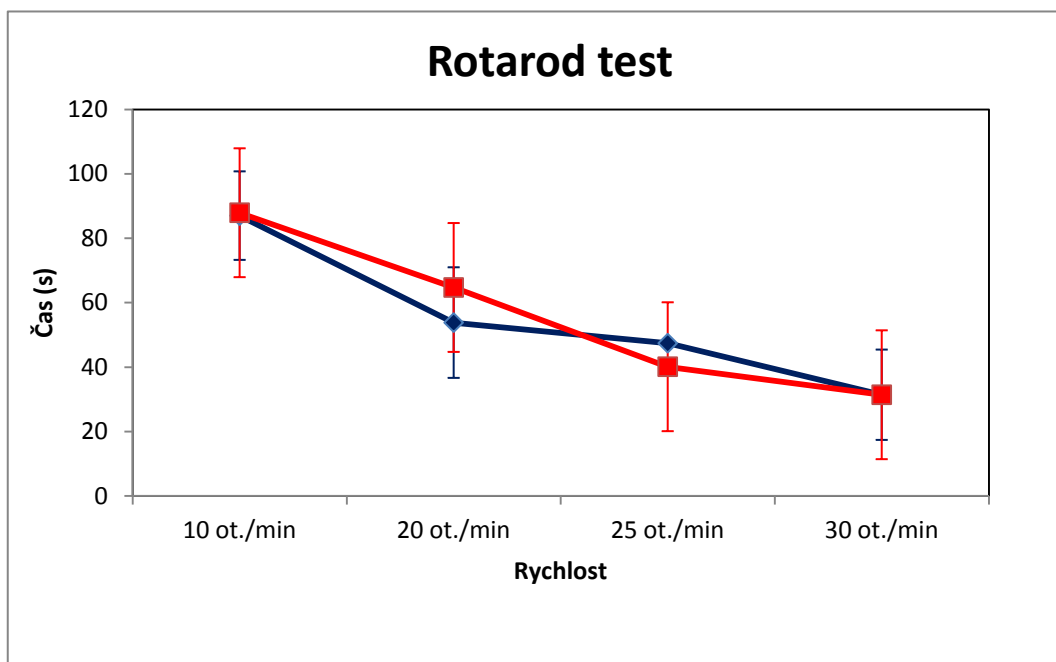
Jako druhý motorický test jsme použili ladder test, kde jsme počítali kolik chyb (propadnutí končetiny žebříkem) udělá zvíře na horizontálním žebříku s pravidelným (mezi příčkami je stejná vzdálenost 1cm) a nepravidelným uspořádáním. Mezi kontrolními zvířaty nebyl prokazatelný rozdíl v počtu chyb při pravidelném a nepravidelném uspořádání. Zvířata po aplikaci 4-AP měla podobný počet chyb při pravidelném uspořádání žebříku, ale při nepravidelném uspořádání, které je pro složitější pro koordinaci pohybu, došlo ke 4-násobnému počtu chyb (viz. Graf 12).

V habituačním testu, což je jednoduchá forma neasociativního učení, bylo u kontrolních zvířat zjištěno výrazné snížení lokomoční aktivity již druhý den testování, zatímco u zvířat po aplikaci 4-AP došlo ke snížení lokomoční aktivity až 3. den, což svědčí o pomalejší habituaci (viz. Graf 13). Obě skupiny zvířat jsou ale schopny si zapamatovat prostředí, kterému jsou opakovaně vystaveny. Mimo to zvířata po aplikaci 4-AP trávila více času v centrální části arény (viz. Graf 14), než v okrajových částech arény (viz. Graf 15). Zvíře v novém prostředí obvykle exploruje po okraji arény. Než se adaptuje na nové prostředí. Proto naše výsledky naznačují pravděpodobně hyperaktivitu a sníženou anxiету zvířat po 4-AP.

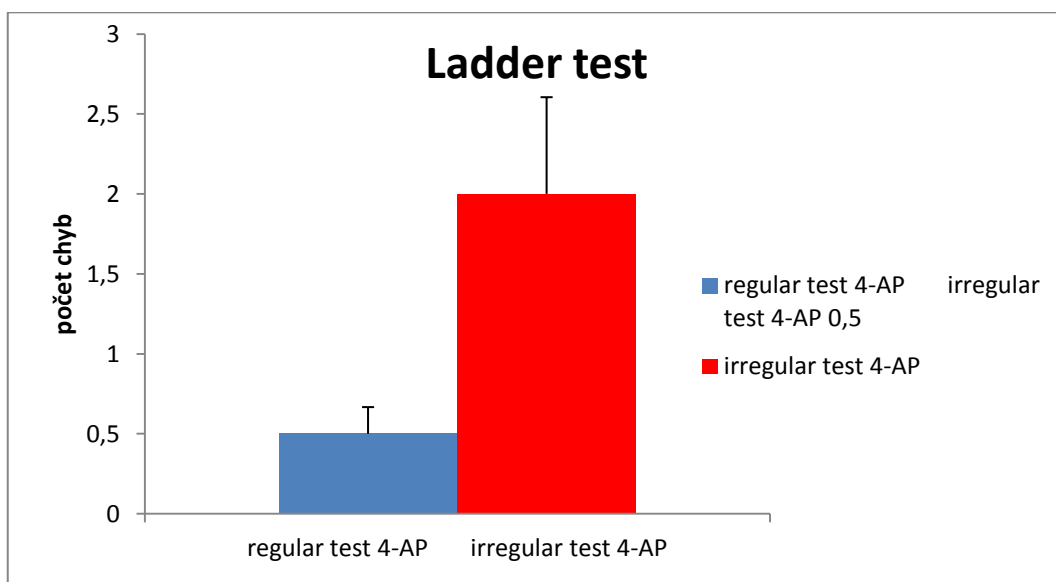
Při testování prostorové paměti a schopnosti učení se skupina zvířat po aplikaci 4-AP učila stejně jako kontrolní zvířata. Během opakovaného testování čas, který zvířata potřebovala k nalezení ostrůvku, klesal (viz. Graf 16). V Probe-trial testu, který byl proveden s časovým odstupem 12 dnů po tréninku (viz. Graf 17) nebyl zjištěn rozdíl mezi zvířaty po 4-AP a kontrolními zvířaty. V grafu je procentuálně vyjádřen čas, který zvířata strávila plaváním v kvadrantu, kde se během fáze učení nacházel ostrůvek a následně byl pro Probe-trial test odstraněn, oproti celkovému času stráveného plaváním v bazénu. Tyto výsledky naznačují, že v našem modelu nebyl poškozen hipokampus, který je strukturou důležitou pro prostorovou paměť a schopnost učení.

Motorické testy

Graf 11

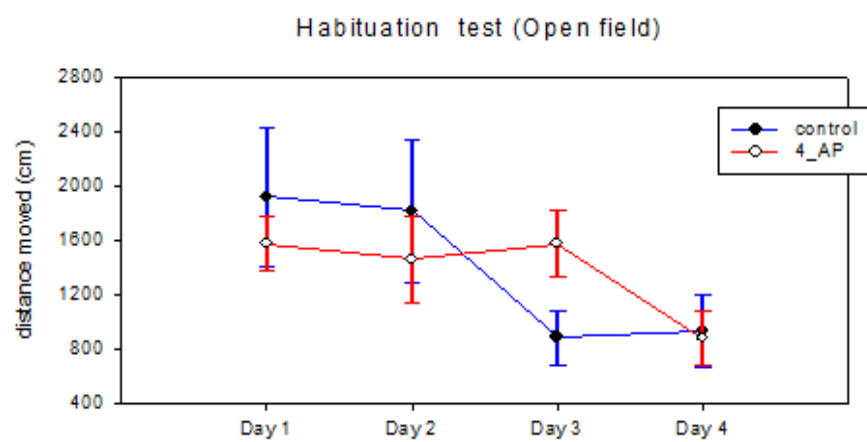


Graf 12

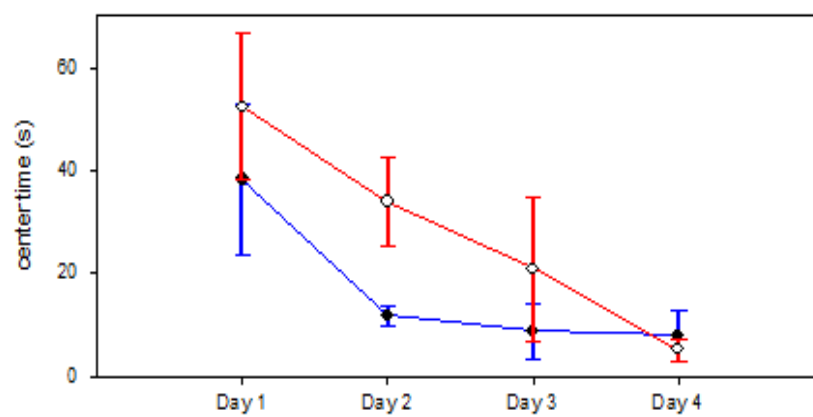


Habituční test- Open-field

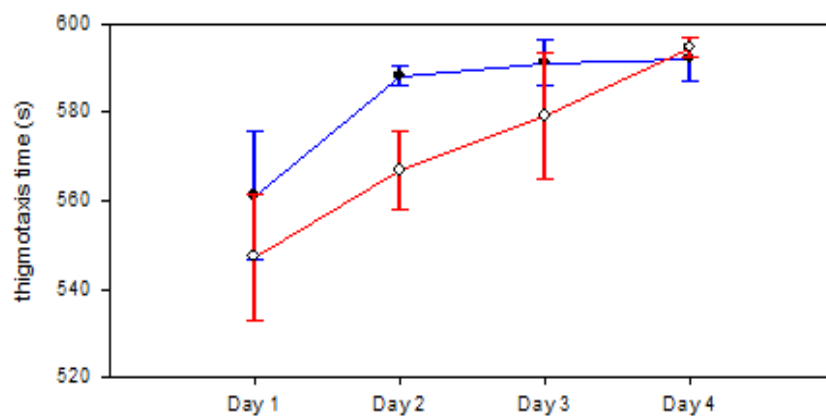
Graf 13



Graf 14

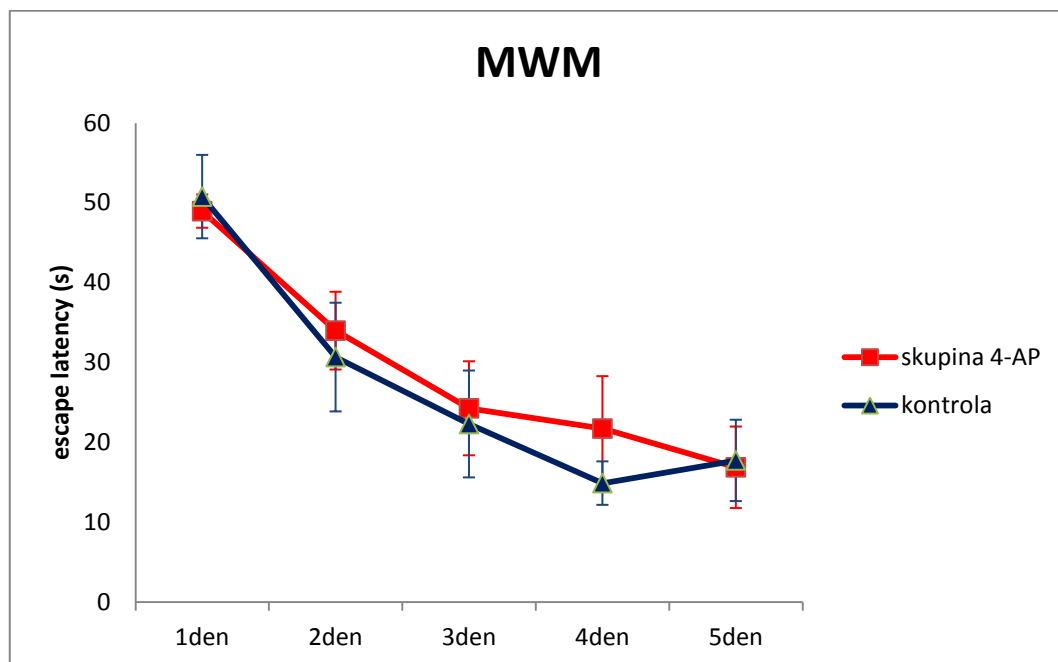


Graf 15

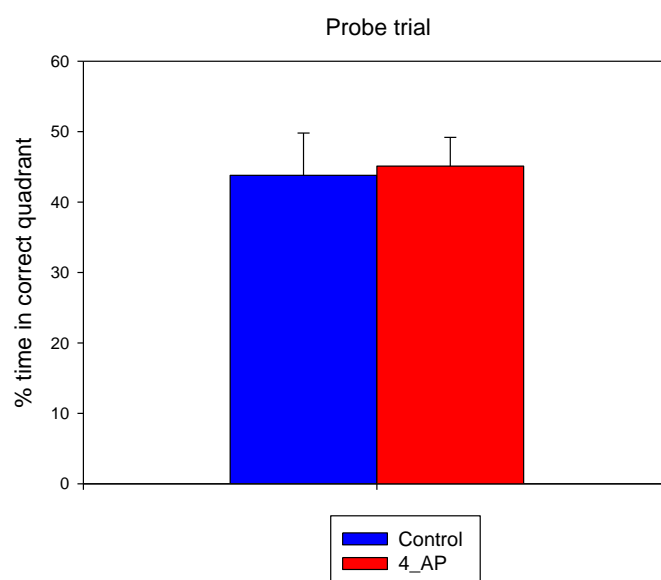


Test prostorového učení a paměti v MWM

Graf 16



Graf 17



Diskuze:

Status epilepticus vyvolaný ICV aplikací 4-AP

V rámci naší studie se nám podařilo potvrdit, že aplikace 4-AP intracerebroventrikulárně dospělým potkanům vede k rozvoji záchvatové aktivity, kterou můžeme označit jako status epilepticus. Záchvaty začaly do 25 minut po ukončení anestezie a do 30 minut po ukončení anestezie již většinou dosahovaly pátého stupně Racinovy škály (Racine, 1972). Kontinuální záchvatová aktivita pak trvala minimálně po následujících 60 minut a pak postupně přecházela zpět v izolované záchvaty, až postupně vymizela.

4-AP je hojně využíván pro vyvolání epileptické aktivity v in vitro podmínkách a to nejenom na akutních zvířecích řezech, kulturách, ale i na ex vivo připravených akutních hipokampových řezech z čerstvě resekovaných lidských hipokampů z důvodu chirurgické léčby farmakorezistentní temporální epilepsie (Levesque et al., 2013). V in vivo podmínkách se systémová aplikace 4-AP využívá výrazně méně než další křečové látky (např. pilokarpin, kainát), protože má závažné systémové vlivy. 4-AP jako blokátor draselných kanálů způsobuje v dávkách vyvolávajících záchvaty život ohrožující srdeční arytmie a další systémové komplikace. Pokud je 4-AP aplikován i.p. v konvulzivní dávce, vyvolá jeden až dva velmi těžké generalizované tonicko klonické záchvaty, které zpravidla končí smrtí zvířete (Vilagi et al., 2009). Z tohoto důvodu se jeví ICV aplikace 4-AP jako vhodnější cesta, která umožňuje vyvolat SE v in vivo podmínkách stejným konvulzantem jako v podmínkách in vitro a zároveň nevyvolává závažné systémové vlivy. Významnou výhodou je spontánní odeznění záchvatové aktivity, protože se tím výrazně snižuje mortalita a rovněž variabilita výsledků z důvodu různě dlouhého SE. V případě dalších látek se pro ukončení respektive snížení důsledků statu aplikují antikonvulziva (např. benzodiazepiny), která však mnohdy epileptickou aktivitu pouze ztlumí (zmírní motorické projevy), ale nezastaví (Kubova, 2002).

Neurodegenerace a imunitní reakce po SE vyvolaným 4-AP

Výsledky naší studie potvrdily předpoklad, že status epilepticus vyvolaný pomocí ICV aplikace 4-AP způsobí neurodegeneraci v řadě oblastí CNS. Detekci degenerujících jsme prováděli pomocí barvení FluoroJade B (FJB), které fluorescenčně značí degenerující neurony bez ohledu na typ buněčné smrti (Schmued et al., 1997). FJB se váže na obnažené a

pozměněné cytoskeletární proteiny neuronu a lze tedy i relativně dobře rozpoznat morfologii neuronu. Některé studie poukazují na relativní buněčnou nespecifičnost barvení FJB a popisují ojedinělou pozitivitu reaktivních astrocytů (Anderson et al., 2005) a mikroglie (Damjanac et al., 2007). Barvení pomocí FJB má značnou výhodu v jednoduchosti barvicího protokolu při porovnání například s technikou imopregnace stříbrem (Schmued et al., 1997). FJB pozitivní buňky se zpravidla objevují 60 minut po buněčnou smrt indukujícím inzultu (např. traumatické poškození, buněčné jedy). Znamená to tedy, že buňky se stanou FJB pozitivní až v jisté fázi buněčné smrti. Přesné mechanismy však nejsou známy.

V naší studii jsme zachytili degeneraci pomocí FJB v řadě struktur. Nejvíce poškozenými strukturami byly thalamus a hipokampus. U některých zvířat se dále objevovalo i poškození amygdaly s entorhinální a piriformní kůrou. Ojedinělé případy vykazovaly neurodegeneraci i v neokortexu. Distribuce poškození v těchto strukturách je obdobná jako v dalších modelech SE. Pilokarpin a kainát však způsobují významnější poškození limbických struktur (především hipokampus), zatímco thalamus je poškozen mírně. V našem modelu bylo prominentní poškození thalamu. Důvod regionální odlišnosti není přesně znám a bude předmětem další studie prováděné v doktorském studiu. Pravděpodobně se však na ní podílí zapojení různých struktur do epileptické aktivity a odlišná exprese 4-AP sensitivních draselných kanálů. Poškození, které jsme zachytili pomocí FJB ve všech časových intervalech bylo pravděpodobně způsobeno přímým vlivem SE, protože rozsah poškození respektive počet FJB pozitivních buněk s odstupem od SE klesal. To je pravděpodobně způsobeno postupným odklizením poškozených neuronů mikroglíí.

Jak bylo uvedeno dříve, glie hraje v mozku významnou roli v udržování stálého vnitřního prostředí. V případě astrocytů to znamená například pufování extracelulárního draslíku a v případě mikroglie iniciace a průběh imunitní reakce při výskytu stimulujících faktorů. Mezi tyto faktory patří kromě patogenů i výrazná stimulace (vyplavení excitačních aminokyselin) a přítomnost poškozených buněk. Při iniciaci zánětlivé reakce hrají výraznou roli právě buňky persistující mikroglie, které po kontaktu s antigenem začnou exprimovat řadu cytokinů (např. IL-1 β), indukují aktivaci astrocytu a atrahují imunokompetentní buňky z krevního oběhu, které pronikají do CNS přes jinak intaktní hemato-encefalickou bariéru. Po odeznění vyvolávajícího stimulu se imunitní reakce tlumí a počet imunokompetentních buněk se snižuje apoptózou. V naší studii jsme zachytili aktivaci mikroglie ve stejných

lokalitách, jako se vyskytovaly FJB pozitivní buňky. Při použití semikvantitativního hodnocení pomocí skórování jsme zaznamenaly přesah oblasti s aktivovanou mikroglíí i mimo oblast neurodegenerace. Časový průběh aktivace v našem experimentu odpovídá časovému průběhu aktivace glie po aplikaci LPS do mozku (Perry and Andersson, 1992)

Status epilepticus vyvolaný pomocí 4-AP u dospělých zvířat vedl ke zvýšení exprese IL-1B v kůře a hipokampu a nárůstu koncentrace povrchového markeru monocyto-makrofágového systému CD68 ve všech sledovaných intervalech (2h, 24h a 7dní). Tento nárůst CD68 může být způsoben nejenom přesunem CD68 pozitivních imunokompetentních buněk do mozkové tkáně, ale i zvýšenou expresí. Při naší studii bohužel došlo k technickým potížím a proto bude imunoblot opakován.

Oxidativní stres po SE vyvolaným 4-AP

V naší studii jsme zjistili zvýšení hladiny 3-nitrotyrosinu, který je považován jako nepřímý marker oxidativní respektive nitrosativního stresu, v obou studovaných strukturách (neokortex, hipokampus) a všech časových intervalech (2h, 24h, 7D). 3-nitrotyrozin (3-NT) vzniká nitrací tyrozinu v proteinech reaktivními sloučeninami dusíku. Ty vznikají v mozku především z oxidu dusnatého (zejména nNOS a iNOS) a jeho reakcemi s dalšími radikály především superoxidovým anionem, který v mozku vzniká majoritně na komplexu I dýchacího řetězce. Nárůst 3-NT byl popsán i dalšími autory po epileptickém statu vyvolaným systémovým podáním kainátu (Liang et al., 2012; Penkowa et al., 2005) ale i pilokarpinem (de Freitas et al., 2010). Produkci 3-NT lze výrazně snížit aplikací látek, které působí jako SOD mimetikum („odbourává“ superoxidový anion např. MnTMPYP - (Folbergrova et al., 2012) nebo dekompozitory peroxynitritu (např. FeTPPS – (Folbergrova et al., 2013)).

Oxidativní stres vyvolaný epileptickou aktivitou způsobuje řadu negativních jevů v nervových buňkách. Posttranslační modifikací proteinů dochází k jejich částečné či úplné inaktivaci a k postupnému snížení funkce řady buněčných systému. Příkladem může být komplex I dýchacího řetězce, který je na straně jedné hlavním producentem superoxidu, na straně druhé je na oxidativní stres vysoce citlivý. Status epilepticus vyvolaný u mláďat vede k částečné inhibici komplexu I, která je nevratná. Inhibici lze předejít koaplikací antioxidantních látek (např. Tempol, MnTMPYP, FeTPPS) (Folbergrova et al., 2010;

Folbergrova and Kunz, 2012). Inhibice komplexu I pak vede k další produkci superoxidu a tím k prohlubování jeho dysfunkce. Oxidativní stres dále způsobuje bodové mutace mitochondriální DNA, které lze vystopovat i v resekátech mozkové tkáně pacientů s farmakorezistentní epilepsií (Zsurka and Kunz, 2010). Další pro vznik epilepsie důležitým cílem oxidativního stresu jsou glutamátové transportery, které umožňují snižovat koncentraci glutamátu v extracelulárním prostředí a tak vyrovnávat poměr inhibičně – excitačních vlivů. (Carl E. Stafstrom, 2004; Trotti et al., 1998).

Funkční důsledky SE vyvolaným 4-AP

Status epilepticus obvykle vyvolává dlouhodobé změny kognitivních funkcí, které mohou, ale nemusí souviset s poškozením odpovídajících mozkových struktur. Tyto změny jsou patrné nejenom v experimentálním modelu epilepsie, ale i u lidských pacientů (Beyenburg et al., 2005), kterým tak výrazně zhoršují běžný život. V experimentu nalezneme u zvířat, která prodělala status epilepticus (pilocarpin, kainát) zvýšenou anxiétu (Muller et al., 2009) a poruchy učení a paměti (De-Mello et al., 2005). V našem experimentu se nám podařilo potvrdit, že i po SE vyvolaným ICV aplikací 4-AP dochází ke zvýšení anxiózního chování, které jsme zjistili zvýšenou lokomocí v open field testu. Oproti tomu učení testované pomocí Morisova vodního bludiště nebylo postiženo. Motorické funkce jsou také u řady modelu alterovány. V našem případě však nedošlo ke změnám oproti kontrolní skupině při využití Ladder testu (přeběhnutí horizontálního žebříku), zaměřeném na test koordinace pohybů, pokud byl využit žebřík s pravidelným rozstupem žebřin. Rozdíl mezi skupinami byl nalezen, pokud byl zvolen test s nepravidelným uspořádáním žebřin. V případě nepravidelného rozmístění žebřin jsou kladeny větší nároky na koordinaci pohybů a dalších senzorických funkcí a proto se zde častěji projeví drobný motorický deficit (Metz and Whishaw, 2002).

Závěr:

V rámci této diplomové práce byl zaveden model epileptického statu vyvolaného ICV aplikací 4-AP. Pomocí histologických a imunohistologických metod jsme prokázali u tohoto modelu SE neurodegenerativní odumírání neuronů ve všech sledovaných oblastech (tj. talamus, hipokampus, bazální ganglia, kůra a oblast amygdaly a okolní entorhinální a piriformní kůry). Nejvíce zasaženou strukturou v našem modelu je talamus. Rozsah poškození se mezi jednotlivými zvířaty se výrazně lišil, což bylo dáno rozdílným průběhem epileptického statu. Nejvyšší množství degenerujících neuronů jsme zjistili v 3. dni od SE. Později průměrné množství degenerujících neuronů klesalo, což je dáno jejich odstraňováním mikroglie při reparaci tkáně.

Dále jsme u našeho modelu prokázali aktivaci mikroglie přímo pomocí imunohistochemií (CD11b) a imunoblotem (CD68). Dále jsme prokázali produkci IL-1b, který je ve zvýšené míře produkován již po 2 hodinách od začátku SE. Z hlediska morfologie mozku aktivované mikroglie ve většině případů kopírovali lokalizaci FJB pozitivních neuronů.

Zhodnocení oxidativního stresu bylo provedeno pomocí metody imunoblot a jako marker byl použit 3-NT. U modelu 4-AP jsme prokázali masivní nárůst volných radikálů již 2 hodiny po začátku SE.

Vzhledem k těmto změnám po SE jsme porovnali funkční vliv prodělaného SE indukovaného 4-AP serií behaviorálních testů. V námi provedených behaviorálních testech jsme prozatím neprokázali žádné zásadní změny kognitivních a motorických funkcí ve skupině zvířat v chronickém experimentu po 8 měsících od vyvolání epileptického statu intracerebroventrikulární aplikací 4-AP. Výsledky behaviorálních testů je nutno brát v tuto dobu jako preliminární výsledky, u kterých bude nutné rozšířit počet zvířat v kontrolní skupině.

Použitá literatura:

Internetové zdroje:

- 1) <http://www.ilae.org/>
- 2) <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/en/>

Adams, B., Von Ling, E., Vaccarella, L., Ivy, G.O., Fahnestock, M., Racine, R.J., 1998. Time course for kindling-induced changes in the hilar area of the dentate gyrus: reactive gliosis as a potential mechanism. *Brain Research* 804, 331-336.

Amano, S., Ikeda, M., Uemura, S., Fukuoka, J., Tsuji, A., Sasahara, M., Hayase, Y., Hazama, F., 1999. Mossy fiber sprouting in the dentate gyrus in a newly developed epileptic mutant, Ihara epileptic rat. *Brain Research* 834, 214-218.

Anderson, K.J., Miller, K.M., Fugaccia, I., Scheff, S.W., 2005. Regional distribution of Fluoro-Jade B staining in the hippocampus following traumatic brain injury. *Experimental Neurology* 193, 125-130.

Arnett, H.A., Mason, J., Marino, M., Suzuki, K., Matsushima, G.K., Ting, J.P.Y., 2001. TNF alpha promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination. *Nature Neuroscience* 4, 1116-1122.

Aronica, E., Ravizza, T., Zurolo, E., Vezzani, A., 2012. Astrocyte immune responses in epilepsy. *Glia* 60, 1258-1268.

Avoli, M., Barbarosie, M., Lucke, A., Nagao, T., Lopantsev, V., Kohling, R., 1996. Synchronous GABA-mediated potentials and epileptiform discharges in the rat limbic system in vitro. *Journal of Neuroscience* 16, 3912-3924.

Barbiro-Michaely, E., Mendelman, A., Mayevsky, A., 2011. The evaluation of nitric oxide involvement in Metrazol induced status epilepticus using multiparametric monitoring. *Brain Research* 1377, 50-59.

Barres, B.A., 2008. The Mystery and Magic of Glia: A Perspective on Their Roles in Health and Disease. *Neuron* 60, 430-440.

Beach, T.G., Woodhurst, W.B., Macdonald, D.B., Jones, M.W., 1995. REACTIVE MICROGLIA IN HIPPOCAMPAL SCLEROSIS ASSOCIATED WITH HUMAN TEMPORAL-LOBE EPILEPSY. *Neuroscience Letters* 191, 27-30.

Behrens, M.M., Sejnowski, T.J., 2009. Does schizophrenia arise from oxidative dysregulation of parvalbumin-interneurons in the developing cortex? *Neuropharmacology* 57, 193-200.

Bender, R.A., Baram, T.Z., 2007. Epileptogenesis in the developing brain: What can we learn from animal models? *Epilepsia* 48, 2-6.

Beyenburg, S., Mitchell, A.J., Schmidt, D., Elger, C.E., Reuber, M., 2005. Anxiety in patients with epilepsy: Systematic review and suggestions for clinical management. *Epilepsy & Behavior* 7, 161-171.

- Brima, T., Mikulecka, A., Otahal, J., 2013. Impacts of Perinatal Induced Photothrombotic Stroke on Sensorimotor Performance in Adult Rats. *Physiological Research* 62, 85-94.
- Chaudhary, G., Malhotra, J., Chaudhari, J.D., Gopinath, G., Gupta, Y.K., 1999. Effect of different lithium priming schedule on pilocarpine-induced status epilepticus in rats. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* 21, 21-24.
- Chen, Z.M., Muscoli, C., Doyle, T., Bryant, L., Cuzzocrea, S., Mollace, V., Mastroianni, R., Masini, E., Salvemini, D., 2010. NMDA-receptor activation and nitroxidative regulation of the glutamatergic pathway during nociceptive processing. *Pain* 149, 100-106.
- Cock, H.R., Tong, X., Hargreaves, I.P., Heales, S.J.R., Clark, J.B., Patsalos, P.N., Thom, M., Groves, M., Schapira, A.H.V., Shorvon, S.D., Walker, M.C., 2002. Mitochondrial dysfunction associated with neuronal death following status epilepticus in rat. *Epilepsy Research* 48, 157-168.
- Damjanac, M., Bilan, A.R., Barrier, L., Pontcharraud, R., Anne, C., Hugon, J., Page, G., 2007. Fluoro-Jade (R) B staining as useful tool to identify activated microglia and astrocytes in a mouse transgenic model of Alzheimer's disease. *Brain Research* 1128, 40-49.
- de Freitas, R.L.M., Santos, I.M.D., de Souza, G.F., Tome, A.D., Saldanha, G.B., de Freitas, R.M., 2010. Oxidative stress in rat hippocampus caused by pilocarpine-induced seizures is reversed by buspirone. *Brain Research Bulletin* 81, 505-509.
- de Vasconcelos, A.P., Marescaux, C., Nehlig, A., 1998. Age-dependent regulation of seizure activity by nitric oxide in the developing rat. *Developmental Brain Research* 107, 315-319.
- De-Mello, N., Souza-Junior, I.Q., Carobrez, A.P., 2005. Pilocarpine prevents age-related spatial learning impairments in rats. *Behavioural Brain Research* 158, 263-268.
- Dube, C., Boyet, S., Marescaux, C., Nehlig, A., 2000. Progressive metabolic changes underlying the chronic reorganization of brain circuits during the silent phase of the lithium-pilocarpine model of epilepsy in the immature and adult rat. *Experimental Neurology* 162, 146-157.
- Eid, T., Lee, T.S.W., Thomas, M.J., Amiry-Moghaddam, M., Bjornsen, L.P., Spencer, D.D., Agre, P., Ottersen, O.P., de Lanerolle, N.C., 2005. Loss of perivascular aquaporin 4 may underlie deficient water and K⁺ homeostasis in the human epileptogenic hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 1193-1198.
- Folbergrova, J., Jesina, P., Haugvicova, R., Lisy, V., Houstek, J., 2010. Sustained deficiency of mitochondrial complex I activity during long periods of survival after seizures induced in immature rats by homocysteic acid. *Neurochemistry International* 56, 394-403.
- Folbergrova, J., Jesina, P., Nuskova, H., Houstek, J., 2013. Antioxidant enzymes in cerebral cortex of immature rats following experimentally-induced seizures: upregulation of mitochondrial MnSOD (SOD2). *International Journal of Developmental Neuroscience* 31, 123-130.
- Folbergrova, J., Kunz, W.S., 2012. Mitochondrial dysfunction in epilepsy. *Mitochondrion* 12, 35-40.
- Folbergrova, J., Otahal, J., Druga, R., 2012. Brain superoxide anion formation in immature rats during seizures: Protection by selected compounds. *Experimental Neurology* 233, 421-429.
- Fujikawa, D.G., 2005. Prolonged seizures and cellular injury: Understanding the connection. *Epilepsy & Behavior* 7, S3-S11.

Gonzalez-Martinez, J.A., Model, G., Ying, Z., Prayson, R.A., Bingaman, W.E., Najm, I.M., 2009. Neuronal nitric oxide synthase expression in resected epileptic dysplastic neocortex. *Journal of Neurosurgery* 110, 343-349.

Han, Y.X., Lin, Y.T., Xu, J.J., Cao, L.L., Liu, X.W., Jiang, H., Chi, Z.F., 2011. STATUS EPILEPTICUS STIMULATES PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTOR gamma COACTIVATOR 1-alpha/MITOCHONDRIAL ANTIOXIDANT SYSTEM PATHWAY BY A NITRIC OXIDE-DEPENDENT MECHANISM. *Neuroscience* 186, 128-134.

Hellier, J.L., Patrylo, P.R., Buckmaster, P.S., Dudek, F.E., 1998. Recurrent spontaneous motor seizures after repeated low-dose systemic treatment with kainate: assessment of a rat model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Research* 31, 73-84.

Kovacs, R., Rabanus, A., Otahal, J., Patzak, A., Kardos, J., Albus, K., Heinemann, U., Kann, O., 2009. Endogenous Nitric Oxide Is a Key Promoting Factor for Initiation of Seizure-Like Events in Hippocampal and Entorhinal Cortex Slices. *Journal of Neuroscience* 29, 8565-8577.

KUBOVÁ, Hana. Epileptogeneza v nezralém mozku: zkušenost z experimentálních studií: habilitační práce. 2002. 54 l., [68] l. příl

Leite, J.P., Garcia-Cairasco, N., Cavalheiro, E.A., 2002. New insights from the use of pilocarpine and kainate models. *Epilepsy Research* 50, 93-103.

Levesque, M., Salami, P., Behr, C., Avoli, M., 2013. Temporal lobe epileptiform activity following systemic administration of 4-aminopyridine in rats. *Epilepsia* 54, 596-604.

Liang, L.P., Ho, Y.S., Patel, M., 2000. Mitochondrial superoxide production in kainate-induced hippocampal damage. *Neuroscience* 101, 563-570.

Liang, L.P., Waldbaum, S., Rowley, S., Huang, T.T., Day, B.J., Patel, M., 2012. Mitochondrial oxidative stress and epilepsy in SOD2 deficient mice: Attenuation by a lipophilic metalloporphyrin. *Neurobiology of Disease* 45, 1068-1076.

Lukasiuk, K., Dabrowski, M., Adach, A., Pitkanen, A., 2006. Epileptogenesis-related genes revisited. *Functional Genomics and Proteomics in the Clinical Neurosciences* 158, 223-241.

Lumme, A., Soinila, S., Sadeniemi, M., Halonen, T., Vanhatalo, S., 2000. Nitric oxide synthase immunoreactivity in the rat hippocampus after status epilepticus induced by perforant pathway stimulation. *Brain Research* 871, 303-310.

Magloczky, Z., Freund, T.F., 2005. Impaired and repaired inhibitory circuits in the epileptic human hippocampus. *Trends in Neurosciences* 28, 334-340.

McTigue, D.M., Tripathi, R.B., 2008. The life, death, and replacement of oligodendrocytes in the adult CNS. *Journal of Neurochemistry* 107, 1-19.

Metz, G.A., Whishaw, I.Q., 2002. Cortical and subcortical lesions impair skilled walking in the ladder rung walking test: a new task to evaluate fore- and hindlimb stepping, placing, and co-ordination. *Journal of Neuroscience Methods* 115, 169-179.

- Muller, C.J., Bankstahl, M., Groticke, I., Loscher, W., 2009. Pilocarpine vs. lithium-pilocarpine for induction of status epilepticus in mice: Development of spontaneous seizures, behavioral alterations and neuronal damage. *European Journal of Pharmacology* 619, 15-24.
- Paxinos, G., Watson, Ch., 1998. The rat brain in stereotaxic coordinates, Academia Press
- Parent, J.M., Janumpalli, S., McNamara, J.O., Lowenstein, D.H., 1998. Increased dentate granule cell neurogenesis following amygdala kindling in the adult rat. *Neuroscience Letters* 247, 9-12.
- Penkowa, M., Florit, S., Giralt, M., Quintana, A., Molinero, A., Carrasco, J., Hidalgo, J., 2005. Metallothionein reduces central nervous system inflammation, neuro degeneration, and cell death following kainic acid-induced epileptic seizures. *Journal of Neuroscience Research* 79, 522-534.
- Perry, V.H., Andersson, P.B., 1992. THE INFLAMMATORY RESPONSE IN THE CNS. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 18, 454-459.
- Pitkanen, A., Nissinen, J., Nairismagi, J., Lukasiuk, K., Grohn, O.H.J., Miettinen, R., Kauppinen, R., 2002. Progression of neuronal damage after status epilepticus and during spontaneous seizures in a rat model of temporal lobe epilepsy. *Do Seizures Damage the Brain* 135, 67-83.
- Racine, R.J., 1972. MODIFICATION OF SEIZURE ACTIVITY BY ELECTRICAL STIMULATION .2. MOTOR SEIZURE. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology* 32, 281-&.
- Rakhade, S.N., Jensen, F.E., 2009. Epileptogenesis in the immature brain: emerging mechanisms. *Nature Reviews Neurology* 5, 380-391.
- Sandberg, R., Yasuda, R., Pankratz, D.G., Carter, T.A., Del Rio, J.A., Wodicka, L., Mayford, M., Lockhart, D.J., Barlow, C., 2000. Regional and strain-specific gene expression mapping in the adult mouse brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 11038-11043.
- Scharfman, H.E., Goodman, J.H., Sollas, A.L., 2000. Granule-like neurons at the hilar/CA3 border after status epilepticus and their synchrony with area CA3 pyramidal cells: Functional implications of seizure-induced neurogenesis. *Journal of Neuroscience* 20, 6144-6158.
- Schmued, L.C., Albertson, C., Slikker, W., 1997. Fluoro-Jade: A novel fluorochrome for the sensitive and reliable histochemical localization of neuronal degeneration. *Brain Research* 751, 37-46.
- Schummers, J., Yu, H.B., Sur, M., 2008. Tuned responses of astrocytes and their influence on hemodynamic signals in the visual cortex. *Science* 320, 1638-1643.
- Sofroniew, M.V., 2009. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends in Neurosciences* 32, 638-647.
- Sofroniew, M.V., Vinters, H.V., 2010. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathologica* 119, 7-35.
- Stafstrom, Carl E., The Role of Glutamate Transporters in Developmental Epilepsy: A Concept in Flux , *Epilepsy Curr.* 2004 November; 4(6): 243–244.

Trotti, D., Danbolt, N.C., Volterra, A., 1998. Glutamate transporters are oxidant-vulnerable: a molecular link between oxidative and excitotoxic neurodegeneration? Trends in Pharmacological Sciences 19, 328-334.

Turski, W.A., Cavalheiro, E.A., Schwarz, M., Czuczwar, S.J., Kleinrok, Z., Turski, L., 1983. LIMBIC SEIZURES PRODUCED BY PILOCARPINE IN RATS - BEHAVIORAL, ELECTROENCEPHALOGRAPHIC AND NEUROPATHOLOGICAL STUDY. Behavioural Brain Research 9, 315-335.

Vezzani, A., Maroso, M., Balosso, S., Sanchez, M.A., Bartfai, T., 2011. IL-1 receptor/Toll-like receptor signaling in infection, inflammation, stress and neurodegeneration couples hyperexcitability and seizures. Brain Behavior and Immunity 25, 1281-1289.

Vilagi, I., Dobo, E., Borbely, S., Czege, D., Molnar, E., Mihaly, A., 2009. Repeated 4-aminopyridine induced seizures diminish the efficacy of glutamatergic transmission in the neocortex. Experimental Neurology 219, 136-145.

Viviani, B., Bartesaghi, S., Gardoni, F., Vezzani, A., Behrens, M.M., Bartfai, T., Binaglia, M., Corsini, E., Di Luca, E., Galli, C.L., Marinovich, M., 2003. Interleukin-1 beta enhances NMDA receptor-mediated intracellular calcium increase through activation of the SRC family of kinases. Glia, 57-57.

White, B.C., Sullivan, J.M., DeGracia, D.J., O'Neil, B.J., Neumar, R.W., Grossman, L.I., Rafols, J.A., Krause, G.S., 2000. Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. Journal of the Neurological Sciences 179, 1-33.

Wojtal, K., Gniatkowska-Nowakowska, A., Czuczwar, S.J., 2003. Is nitric oxide involved in the anticonvulsant action of antiepileptic drugs? Polish Journal of Pharmacology 55, 535-542.

Zámečník J., Tichý M. Patomorfologie změn v epileptické tkáni, Postgraduální medicína 6/2005

Zsurka, G., Kunz, W.S., 2010. Mitochondrial dysfunction in neurological disorders with epileptic phenotypes. Journal of Bioenergetics and Biomembranes 42, 443-448.